Stickstoffbindung

durch einige auf abgestorbenen Pflanzen häufige Hyphomyceten.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

HERMANN FROEHLICH
AUS BASEL.

Mit 3 Textfiguren.

(Sonder-Abdruck aus den Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik, Band XLV, Heft 2).

Leipzig
Gebrüder Borntraeger
1908

Stickstoffbindung

durch einige auf abgestorbenen Pflanzen häufige Hyphomyceten.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOCTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

HERMANN FROEHLICH
AUS BASEL.

ACAD
LUGD BAT
BIBL.

Mit 3 Textfiguren.

(Sonder-Abdruck aus den Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik, Band XLV, Heft 2).

Leipzig
Gebrüder Borntraeger
1908

Genehmigt von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professor Dr. A. Fischer und Professor Dr. H. Kreis.

Basel, den 5. Juli 1907.

Prof. Dr. F. Zschokke,
Dekan.

Die Befähigung zur Bindung des elementaren Stickstoffs wird gegenwärtig nur wenigen Formen aus dem Reiche der Bakterien zugestanden. Alle sorgfältig angestellten Versuche mit grünen Pflanzen haben bis jetzt negative Resultate ergeben, und die wenigen Arbeiten, welche für Pilze die Assimilation freien Stickstoffs auf Grund analytischer Befunde behaupteten, haben überall eine sehr zurückhaltende, häufig geradezu ablehnende Besprechung gefunden.

Da diese Arbeiten in allen Sammelreferaten über die Stickstoffbindung durch Mikroorganismen neben den zahllosen bakteriologischen Untersuchungen nur mit summarischer Kürze behandelt werden, und da eine vollständige Übersicht noch fehlt, mag die folgende Zusammenstellung etwas ausführlicher sein.

I. Historisches über die Assimilation von elementarem Stickstoff durch Pilze.

Die älteste, nur von B. Frank (I, S. 376) zitierte Angabe stammt von Jodin aus dem Jahre 1862. Jodin beobachtete reichliches Pilzwachstum auf stickstofffreien Nährlösungen („ . . . très sensiblement exemptes de composés azotés"), welche nur Zucker, Weinsäure, Glyzerin oder andere ternäre Verbindungen enthielten. Wurden die Kulturen verschlossen gehalten, so ließ sich feststellen, daß der eingeschlossenen Luft stets Stickstoff entzogen wurde und zwar 6—7% des gleichzeitig zur Atmung verbrauchten Sauerstoffs. Reine Kulturen haben Jodin nicht vorgelegen. Bemerkenswert ist aber die Anwendung der gasanalytischen Methode zum Nachweis der Stickstoffbindung.

B. Frank selbst gibt im Anschluß an dieses Zitat und auch an anderer Stelle (II, S. 146) an, daß er bei *Penicillium cladosporioïdes* Fres. (Syn.: *Hormodendron cladosporioïdes* Sacc.) „in vollkommen stickstofffreien Nährlösungen von reinem Traubenzucker und den erforderlichen Aschenbestandteilen“ einen Stickstoffgewinn von 3,5 mg konstatieren konnte, bei Verwendung von 65 ccm Lösung und bei Ventilation durch einen mit Schwefelsäure gewaschenen Luftstrom. Die Kulturdauer betrug ca. 10 Monate.

Berthelot (S. 842) erhielt bei *Alternaria tenuis* und bei *Aspergillus niger* positive Resultate. Er fand nach einem Monat bei *Aspergillus* Stickstoffzunahmen von 5,8—10,0 mg, bei *Alternaria* nach ungefähr 4 Monaten solche von 4,6—9,1 mg (nach Abzug der für ungeimpfte Kontrollösungen angegebenen Zunahme von 2,0 mg.) Leider fehlen Angaben über die Quantität der verwendeten Nährlösung. Berthelot teilt mit, daß in den Kulturen von *Aspergillus* Weinsäure, von *Alternaria* Zucker angegriffen wurde.

Seine Resultate wurden wenigstens teilweise durch Puriewitsch bestätigt. Puriewitsch (S. 342) kultivierte *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* auf Nährlösungen, welche enthielten auf 100 ccm Wasser:

0,4 g Monokaliumphosphat
0,4 g Calciumchlorid
0,2 g Magnesiumsulfat
3,0 g Weinsäure
5,0—30,0 g Rohrzucker

verschiedene Quantitäten Ammoniumnitrat, einige Tropfen einer verdünnten Phosphorsäurelösung zur Verhinderung des Bakterienwachstums.

Die (übrigens nur kleinen) Zugaben von Ammoniumnitrat sollen sich als durchaus unentbehrlich für das Wachstum der beiden Pilze erwiesen haben. Die Kulturen, zu je 25 und 50 ccm, wurden unter Glasglocken aufbewahrt, denen durch Schwefelsäure und Kalilauge gereinigte Luft zugeführt wurde. Die Stickstoffgewinne betrugen nach 2 Monaten:

	in . . . Kulturen	im Maximum	im Minimum	im Mittel
bei *Aspergillus niger* . .	16	6,9 mg	1,5 mg	4,51 mg
„ *Penicillium glaucum*	5	5,2 „	2,0 „	3,26 „

Die Versuche von Puriewitsch ergeben eine Steigerung der Stickstoffgewinne bei Erhöhung des Gehalts an Ammoniumnitrat und an Zucker.

Saida (S. [107]) unterwarf neben *Aspergillus niger* noch sechs andere Pilze, *Phoma Betae*, *Mucor stolonifer*, *Acrostalagmus cinnabarinus*, *Endococcus purpurascens*, *Monilia variabilis* und *Fusisporium moschatum* der experimentellen Untersuchung.

Aspergillus zeigte dabei das gleiche Verhalten bei Gegenwart und bei Abwesenheit von gebundenem Stickstoff. Er assimilierte in 50 ccm Lösung während $2^1/_2$ Monaten (in 5 Versuchen)

im Maximum 1,77 mg
im Minimum 1,18 „
im Mittel 1,42 „
} freien Stickstoff.

Von den 6 anderen Formen lieferten nur *Phoma Betae*, *Mucor stolonifer* und *Endococcus purpurascens* positive Resultate. Bei *Phoma* und *Mucor* wurde die Stickstoffbindung durch kleine Gaben von Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat oder Ammoniumkarbonat wesentlich gesteigert. *Endococcus* assimilierte überhaupt nur bei Gegenwart von Ammoniumkarbonat. Die mittleren Stickstoffgewinne auf stickstofffreier und auf stickstoffhaltiger Nährlösung sind für diese 3 Pilze in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	N-freie Lösungen		N-haltige Lösungen	
	Mittlerer N-Gewinn	in ... Versuchen	Mittlerer N-Gewinn	in ... Versuchen
Phoma Betae	0,85 mg	4	3,33 mg	12
Mucor stolonifer	0,89 „	1	1,77 „	2
Endococcus purpurascens .	0,00 „	1	1,85 „	3

Bemerkt sei, daß *Phoma Betae* auf Zuckerrübendekokt mit dem sehr hohen Stickstoffgehalt von 27,01 mg in 50 ccm den größten Stickstoffgewinn lieferte im Betrag von 10,53 mg.

Die neueste einschlägige Arbeit ist eine vorläufige Mitteilung von Ch. Ternetz (S. 267). Die Mengen des gebundenen Stickstoffs sind auch bei dem noch nicht genauer bestimmten, von *Oxycoccus*-Wurzeln isolierten, dort vielleicht Mycorrhiza bildenden Pilz geringe: 0,98—3,29 mg in Kulturen von 100—150 ccm Lösung, welche durch sorgfältig mit konzentrierter Schwefelsäure und Kalilauge gereinigte Luft ventiliert wurden. Die Stickstoffbindung geht bei aërober Lebensweise und ohne Vergärung der Dextrose vor sich.

Weitere Angaben über Versuche mit Kulturen liegen meines Wissens bis heute noch nicht vor. Aus den eben besprochenen ergibt sich die Befähigung zur Stickstoffassimilation für folgende Pilzformen:

Penicillium cladosporioïdes Fres. (Syn.: *Hormodendron cladosporioïdes* Sacc.) . . . . nach Frank.
Aspergillus niger nach Berthelot, Puriewitsch und Saida.
Penicillium glaucum . . . . . nach Puriewitsch.
Alternaria tenuis . . . . . „ Berthelot.
Phoma Betae . . . . . „ Saida.
Mucor stolonifer . . . . . „ Saida.
Endococcus purpurascens . . . . . „ Saida.
„*Oxycoccus*-Pilz“ v. Ternetz . . . . . „ Ternetz.

Diesen positiven Resultaten widersprechen, soviel mir bekannt geworden ist, nur wenige entgegengesetzte Befunde. Davon bezieht sich einer auf *Penicillium glaucum*, alle anderen betreffen ausschließlich *Aspergillus niger*. Czapek (II, S. 559), Alfred Koch (S. 12) und Winogradsky (s. Koch) teilen mit, daß sie bei *Aspergillus niger* Stickstoffbindung nicht beobachten konnten. Czapek (I, S. 125) erwähnt eine mir nicht im Original zugängliche Angabe von Boussingault (S. 302), wonach *Penicillium glaucum* keinen Stickstoff assimilieren soll.

Für alle übrigen oben zusammengestellten Pilzformen sind analytische Daten mit negativem Ergebnis noch nicht beigebracht worden.

II. Die untersuchten Pilzformen: ihr Vorkommen auf abgestorbenem Pflanzenmaterial und ihre Isolierung.

Während bis jetzt nur beliebig aufgegriffene Schimmelpilze untersucht wurden, habe ich 4 ihrem biologischen Verhalten nach eng verwandte Formen auf ihre Befähigung zur Stickstoffbindung geprüft.

Die bisherigen Erfahrungen ergeben, daß zur Kultur stickstoffassimilierender Lebewesen eine gute Energiequelle, wie sie z. B. die Kohlehydrate bieten, nötig ist. Nun häufen sich jeden Herbst auf den von Pflanzenwuchs bedeckten Gebieten riesige Mengen von Kohlehydraten an, in Form der abgestorbenen Stengel und Blätter. Auf diesem an Stickstoff relativ armen Nährboden gedeiht während des ganzen Winters, in geringerem Maße auch in den heißen Sommermonaten, eine überaus reiche Pilzvegetation. Wenn irgendwo, so

war hier die Wahrscheinlichkeit gegeben, stickstoffbindende Formen zu isolieren. Die ersten, im Sommersemester 1905 unternommenen Experimente ergaben Resultate, die zu den weitern Untersuchungen ermunterten, deren Ergebnisse in dieser Arbeit zusammengestellt sind.

Im Mittelpunkt steht naturgemäß der einwandfreie Nachweis der Stickstoffbindung. Über das Verhalten auf dem natürlichen Substrat, dem Zellgerüst der abgestorbenen Pflanzenteile, über die Abhängigkeit von verschiedenen Lebensbedingungen, wie Licht, Temperatur, Sauerstoff, sowie über die Beziehungen zur Kohlenstoffquelle konnten nur nebenbei Nachforschungen angestellt werden. Ihre Darstellung beansprucht dementsprechend nur einen geringen Raum.

A. Das Isolierungsverfahren.

Bei den ersten Versuchen wurde die Winogradskysche Nährlösung für *Clostridium Pasteurianum* angewendet (Winogradsky I, S. 43); sie enthielt auf 100 ccm destilliertes Wasser:

0,1 g Monokaliumphosphat
0,02 g Magnesiumsulfat
Spuren Natriumchlorid, Ferrosulfat u. Mangansulfat
2,0 g Dextrose
ca. 4 g Magnesiumkarbonat.

Das von Winogradsky zur Neutralisation der Gärungssäuren zugesetzte Calciumkarbonat war dabei durch Magnesiumkarbonat ersetzt worden.

Portionen von ungefähr 50 ccm wurden in kleine, peinlich gereinigte Erlenmeyerkolben gegeben und $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden in strömendem Dampf sterilisiert. Abgestorbene Stengelteile beliebiger Provenienz, die sich im botanischen Garten und in der nächsten Umgebung von Basel eben fanden, wurden mit sterilisiertem Skalpell auf sterile Objektträger abgeschabt. Mit dem abgeglühten Platindraht wurden kleine Fetzen der Schabe in die Nährlösung übertragen. Die geimpften Kulturen wurden unter einer Glasglocke aufgehoben, deren Innenraum gegen flüchtige Stickstoffverbindungen abgesperrt war: in den Tubulus der Glocke war eine aus 2 U-Röhren bestehende Absorptionsvorrichtung eingedichtet. Die Röhren enthielten Bimssteinsplitter, die im einen Rohr mit konzentrierter Schwefelsäure, im andern mit starker Kalilauge getränkt waren.

Schon nach 2—3 Tagen waren regelmäßig die ersten Mycelflocken zu beobachten. Im Laufe von 2—3 Wochen wuchsen große, die Kulturkolben oft ganz ausfüllende Mycelien heran.

Zur Gewinnung von Reinkulturen kam von festen Nährböden einzig Agar in Betracht. Gelatine war als stickstoffreiches Substrat von vornherein nicht zu verwenden. Es wurde folgender Nähragar hergestellt: auf 100 ccm Wasser kamen

0,1 g Monokaliumphosphat
0,02 g Magnesiumsulfat
Spuren Natriumchlorid und Ferrosulfat
2,0 g Dextrose
1,5 g pulverisierter Agar-Agar.

An Salz- und Dextrosegehalt entsprach er der bei den Vorversuchen benützten Nährlösung. Magnesiumkarbonat wurde weggelassen, da Säuerung des Substrats nicht stattfand; der Zusatz von Mangansulfat unterblieb, als entbehrlich, bei diesen und allen späteren Kulturen ebenfalls. Der Agar war natürlich nicht in dem Grade „stickstofffrei" herzustellen, wie die Nährlösung. Die geringe Menge von 1,5 g Agar-Agar konnte nach Königs Angaben bis zu 0,028 g Stickstoff enthalten.

Die mit dem eben beschriebenen Nähragar in Petrischalen gegossenen Platten wurden wie die oben erwähnten Flüssigkeitskulturen geimpft. Sie ergaben meist schon am zweiten oder dritten Tag kleine gut isolierte Mycelien, von denen leicht steril auf neue Platten übergeimpft werden konnte. Diese lieferten mir fast ausnahmslos gänzlich reines Material.

Bakterienkolonien waren nur äußerst selten zu beobachten, wohl infolge der absichtlich sauer gelassenen Reaktion. (Gehalt an Monokaliumphosphat!)

So gewann ich für die physiologischen Untersuchungen ein völlig reines Sporenmaterial.

Bei allen späteren Versuchen wurde die Dextrosekonzentration in Agar und Nährlösung von 2 auf 5 % erhöht.

B. Die isolierten Pilze und ihre Verbreitung.

Ich hatte anfangs gehofft, entsprechend der Reichhaltigkeit der Pilzflora auf den abgestorbenen Pflanzenteilen, eine größere Zahl von Formen zu isolieren, sah mich aber bald getäuscht. Bei Verwendung der verschiedensten Pflanzenreste und bei Berücksichtigung der mannigfachsten Fundorte aus der Umgebung von Basel ergaben sich regelmäßig nur einige wenige Pilzformen.

Sie gehören alle zu der von Lindau als *Hyphomyceten* zusammengefaßten Gruppe der *Fungi imperfecti*. Dann und wann

zeigten sich auch Pykniden, die ja auf dem Ausgangsmaterial so häufig sind. Die Versuche zur Reinkultur der zugehörigen Organismen blieben aber erfolglos.

Die Identifizierung und namentlich die Speziesbestimmung war nicht sehr leicht. Herr Prof. Lindau hatte die Güte, Agarkulturen zu untersuchen, wofür ihm an dieser Stelle der beste Dank ausgesprochen sei. Die von Herrn Prof. Lindau z. T. verifizierten, z. T. ergänzten Bestimmungen ergaben für die 4 in dieser Arbeit berücksichtigten Pilze folgende Zugehörigkeit:

1. *Alternaria tenuis* Nees. Die mir vorliegende Form unterscheidet sich von der als *Alternaria tenuis* Nees. überall abgebildeten durch die kürzere, gedrungenere Gestalt der Sporen und durch die namentlich in den äußersten Partien der Sporenketten sehr kurzen „fadenförmigen Zwischenstücke".
2. *Macrosporium commune* Rbh.
3. *Hormodendron cladosporioïdes* Sacc. (Syn.: *Penicillium cladosporioïdes* Fres.)
4. *Cladosporium herbarum* Link.

Es ist schon wiederholt, so von Laurent, Costantin und von Janczewsky ein Zusammenhang der beiden letzten Formen unter sich und mit anderen behauptet worden. Ich kann auf Grund der während fast 2 Jahren (auf dem gleichen Substrat!) durchgeführten Kulturreihen die Angaben von Schostakowitsch ganz bestätigen: Wir haben es hier mit zwei sich allerdings morphologisch und teilweise auch physiologisch sehr nahestehenden, aber dennoch völlig selbständigen Organismen zu tun. Ich konnte wie Schostakowitsch niemals eine Überführung im einen oder andern Sinne wahrnehmen, ebensowenig eine Entwicklungszugehörigkeit zu anderen Pilzen. Ob bei *Hormodendron cladosporioïdes* und *Cladosporium herbarum*, sowie bei den 2 anderen Formen, Beziehungen zu Ascomyceten oder zu anderen *Fungi imperfecti* noch vorhanden sind oder nicht, kann auf Grund meiner Erfahrungen natürlich nicht entschieden werden. Sichergestellt ist dadurch bloß ihre Artselbständigkeit.

Die genannten 4 Pilze fanden sich sozusagen auf jedem Ausgangsmaterial. Ich stellte sie bei den Isolierungsversuchen fest auf folgenden dürren Resten und zu folgenden Zeiten:

1. *Alternaria tenuis:*

	auf unbestimmtem Material			am	2. Mai 1905.
	auf dem Stengel von	*Rumex Acetosa*		„	30. Mai 1905.
	„ „ „ „	*Dipsacus silvestris*			
	„ „ „ „	*Cichorium Intybus*		„	8. Juni 1905.
	„ „ „ „	*Centaurea maculosa*		„	2. Oktober 1905.
	„ „ „ einer	Umbellifere[1])		„	22. November 1905.
*	„ „ „ von	*Sisymbrium officinale*		„	2. April 1906.
	„ „ „ „	*Dianthus Carthusianorum*			

2. *Macrosporium commune:*

○	auf Deckschuppen von	*Dipsacus silvestris*		am	12. Mai 1905.
	„ dem Stengel „	*Rumex Acetosa*		„	30. Mai 1905.
* ○	„ „ Blatt „	*Populus pyramidalis*		„	13. Oktober 1905.

3. *Hormodendron cladosporioïdes:*

	auf unbestimmtem Material			am	12. Mai 1905.
	„ dem Stengel von	*Centaurea maculosa*		„	2. Oktober 1905.
*	„ „ „ „	*Lappa minor*		„	10. Oktober 1905.
○	„ „ Blatt „	*Acer Pseudoplatanus*		„	21. Oktober 1905.
	„ „ Stengel „	*Rumex Acetosa*		„	18. November 1905.
	„ „ „ „	*Spiraea Aruncus*			
	„ „ „ einer	Umbellifere[1])		„	22. November 1905.
○	„ „ „ von	*Scirpus lacustris*			

4. *Cladosporium herbarum:*

	auf unbestimmtem Material			am	4. Mai 1905.
	„ dem Blatt von	*Populus pyramidalis*		„	13. Oktober 1905.
	„ „ Stengel „	*Scirpus lacustris*		„	4. Dezember 1905.
○	„ „ Blatt „	*Quercus pedunculata*		„	29. Dezember 1905.
○	„ „ „ „	*Fagus silvatica*		„	29. Dezember 1905.
*	„ „ Stengel „	*Sisymbrium officinale*		„	19. April 1906.
○	„ „ „ „	*Asparagus officinalis*		„	22. Oktober 1906.

Zu den physiologischen Untersuchungen haben die mit * bezeichneten Stämme gedient.

Auf dem mit ○ angemerkten Material war die mikroskopische Beobachtung der betreffenden Pilzform möglich. Häufig genug waren aber nur noch Büschel leerer Fruchthyphen vorhanden, die eine Identifizierung natürlich nicht mehr gestatteten. In diesen Fällen waren es wohl kleine, in der Schabe steckende Hyphenteile, welche die Mycelien in den Agarplatten lieferten. Daß auch dann, wenn die direkte Beobachtung auf dem Ausgangsmaterial unmöglich war, die Pilze in den Platten wirklich vom Ausgangsmaterial stammten und nicht etwa als zufällig aufgeflogene Verunreinigungen aufzufassen waren, geht indirekt daraus hervor, daß die mit reinem Sporen-

1) Wahrscheinlich: *Heracleum Sphondylium.*

material des einen Pilzes geimpften Kulturen nie durch einen der anderen verunreinigt wurden.

Die 4 Pilze scheinen ohne Wahl alles abgestorbene Pflanzenmaterial zu bewohnen.

III. Wachstum und Stickstoffbindung auf stickstoffarmem Substrat.

Die in der historischen Einleitung kurz berührte, zum Teil recht schwach begründete Kritik, welche die bisherige Literatur erfahren hat, veranlaßt mich in diesem Hauptabschnitt zu einer etwas breiten Darstellung versuchstechnischer Einzelheiten und zu einer eingehenden Widerlegung von Einwänden, die im Sinne der erwähnten Kritik gegen meine Resultate könnten erhoben werden.

A. Methode und Resultate von Kulturversuchen unter möglichst weitgehendem Ausschluß von gebundenem Stickstoff.

Die Zusammensetzung der verwendeten Nährlösung wurde schon in dem Abschnitt über das Isolierungsverfahren (S. 261) mitgeteilt (100 ccm destilliertes Wasser + 0,1 g Monokaliumphosphat + 0,02 g Magnesiumsulfat + Spuren von Natriumchlorid und Ferrosulfat + 2,0 — 5,0 g Dextrose). Alle Chemikalien waren von E. Merck in Darmstadt unter der ausdrücklichen Bezeichnung „garantiert N-frei“ bezogen. Bei der Herstellung und Aufbewahrung der Nährlösung wurde mit peinlichster Sorgfalt verfahren. Sämtliche dabei benützten Glasgefäße wurden vor der Benützung entweder mehrere Tage in eine Lösung von Kaliumbichromat in verdünnter Schwefelsäure eingelegt, oder mit einer Lösung von Kaliumbichromat in konzentrierter Schwefelsäure unmittelbar vor der Verwendung ausgespült, so daß die Glaswände von den anhaftenden, eventuell stickstoffhaltigen Verbindungen völlig befreit wurden.

Das zum Spülen der Gefäße und zur Darstellung der Nährlösung verwendete destillierte Wasser wurde, wenn es nicht gerade frisch hergestellt war, durch Aufkochen von seiner wesentlichsten Stickstoff-Verunreinigung, dem in Laboratoriumsluft wohl stets vorhandenen Ammoniak, befreit.

Die Nährlösung wurde in Mengen von 25—50, oder von genau 100 ccm in Erlenmeyerkolben verteilt, deren Größe so gewählt war,

daß nur ihr unterster, weitester Teil angefüllt wurde. In die so hergerichteten Kulturen wurden nach der Sterilisation (z. T. $^1/_2$ Stunde in strömendem Dampf, z. T. nur $^1/_4$ Stunde im Autoklaven bei 120—130°) mit geradem Platindraht Sporen aus den reinen Agarplatten übertragen.

Die geimpften Kulturen wurden sofort in einem vor flüchtigen Stickstoffverbindungen, wie Ammoniak und Amidokörpern, Stickoxyden und Nitrokörpern geschützten Raum aufgehoben. Als solcher hatte mir bei einer kleinen Zahl der Versuche die früher erwähnte

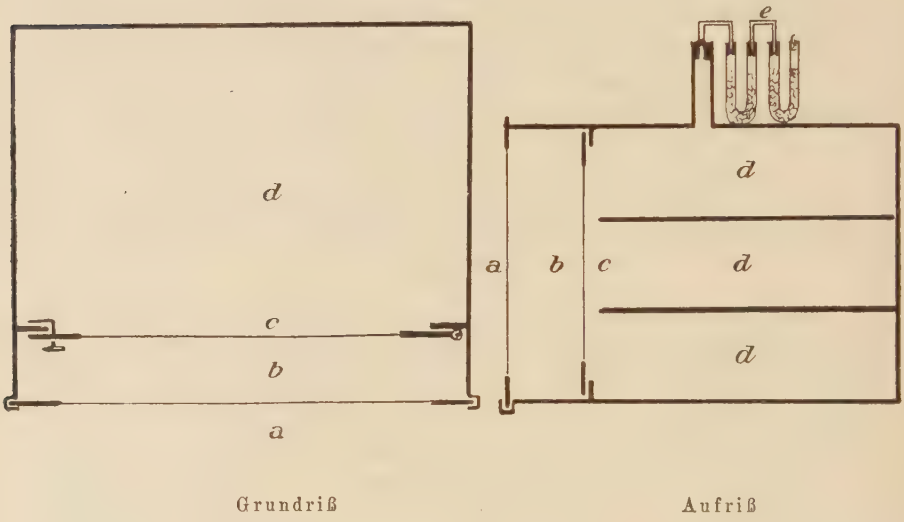

Fig. 1. $^1/_{10}$ nat. Größe. Erklärung im Text.

Vorrichtung gedient. Zur gleichzeitigen Unterbringung von vielen Kulturen und namentlich bei Verwendung großer Kolben war sie viel zu unpraktisch. Den weitaus größten Teil der Kulturen habe ich daher in einem geräumigen, gutgelöteten Zinkkasten untergebracht, dessen Konstruktion und Ausmaß aus der beigefügten Skizze verständlich werden. Die Außenluft hatte zum Kulturraum *(d)* nur auf zwei Wegen Zutritt, auf denen ihr durch konzentrierte Schwefelsäure und starke Kali- oder Natronlauge die flüchtigen Stickstoffverbindungen entzogen wurden: a) durch den „Vorraum“ *(b)* zwischen Schieber *(a)* und Tür *(c)*, b) durch die beiden in der Decke des Kastens eingedichteten U-Röhren *(e)*. Der Gasaustausch durch die Fugen von Schieber

und Tür und durch die beiden mit Bimssteinstücken angefüllten U-Röhren konnte nur ein sehr langsamer, die Wirkung der Absorptionsmittel mußte also eine sehr vollständige sein. Der Kasten hatte neben seiner Geräumigkeit den großen Vorteil, daß ihm jederzeit Kulturen zur Untersuchung entnommen werden konnten, ohne daß bei dem kurzen Öffnen eine erhebliche Verunreinigung der Kulturen mit Stickstoffverbindungen zu befürchten war (vergl. Fig. 1).

Im Sommer 1905 war der Kasten einige Wochen im Laboratorium aufgestellt, nachher aber in dem kleinen, dem Institut angebauten Versuchsgewächshaus, wo die Luft nicht durch gelegentliches Arbeiten mit Chemikalien verunreinigt war.

In der folgenden Tabelle ist die Anzahl der Kulturen angegeben, die mit *Alternaria*, *Macrosporium*, *Hormodendron* und *Cladosporium* unter den eben beschriebenen Kautelen angelegt wurden.

	Alternaria	*Macrosporium*	*Hormodendron*	*Cladosporium*
Kleine Kulturen mit 2% Dextrose . .	2	1	0	2
Kleine Kulturen mit 5% Dextrose . .	14	13	12	15
Große Kulturen mit 5% Dextrose . .	4	3	4	3
Gesamtzahl:	20	17	16	20

Schon nach 2—3 Tagen zeigten sich in allen diesen Kulturen die ersten Mycelflocken, und nach 4—5 Tagen war auch die Fruktifikation regelmäßig im Gange. Alle 4 Pilze bildeten im Laufe von wenigen Wochen sehr kräftige, namentlich in den nur 25 ccm haltenden Kulturen die ganze Nährlösung erfüllende Mycelien. Dabei zeigten sich nur wenige spezifische Differenzen:

Alternaria entwickelte meist nur 1—2 große, häufig der Glaswand ansitzende, wollige Mycelien. Auffallend war in den Flüssigkeitskulturen gegenüber den Agarplatten die sehr kräftige vegetative Entwicklung. Häufig sah man über der Nährlösung einen üppigen graubraunen Hyphenfilz, in welchem Sporen nicht zu finden waren. Diese Erscheinung ist zurückzuführen auf den hohen Feuchtigkeitsgehalt der im Kolben stagnierenden Luft. An Agarplatten läßt sie sich durch Aufbewahrung in feuchter Kammer ebenfalls hervorrufen. — Die Färbung der Mycelien ist anfänglich hell graubraun, später wird sie dunkler, jedoch nicht so sehr wie bei den 3 anderen Formen.

Macrosporium lieferte wie *Alternaria* meist nur ein einziges großes krauses Mycel. Die Erklärung dieser Tatsache ist leicht zu geben: Die flaschenförmigen Sporen von *Alternaria* und die eiförmigen

bis kugeligen Sporen von *Macrosporium* lösen sich beim Impfen als einzige, eben noch sichtbare schwarze Masse vom Platindraht los und setzen sich häufig an der Glaswand fest, während sich die kleinen Sporen von *Hormodendron* und *Cladosporium* in der Flüssigkeit verteilen, so daß hier zahlreiche kleine, dort nur wenige große Mycelien entstehen. — Zuweilen zeigte auch *Macrosporium* über der Lösung einen Filz steriler Hyphen. Die Regel ist jedoch die frühzeitige Entwicklung der Conidien. Die Nährlösung erscheint dann meist schwarz bestäubt.

Hormodendron bildete meist zahlreiche kleinere, oft zusammenfließende Räschen von radiär-strahligem Bau. Am Boden der Kultur erreichten sie meist nur eine geringe Größe. Die Fruktifikation war auf die oberflächlichen Rasen beschränkt. Sie trat frühzeitig auf, lange bevor das vegetative Wachstum des Mycels abgeschlossen war. Durch die dichte Häufung der baumförmig verästelten Conidienstände gewann die Flüssigkeitsoberfläche ein fein pulveriges Aussehen. Ihre olivgrüne Färbung ging mit zunehmendem Alter, ebenso wie das Grün der submersen Mycelpartien immer mehr in ein tiefes Grünschwarz über.

Cladosporium war in den ersten Tagen nach der Impfung von *Hormodendron* kaum zu unterscheiden. Erst allmählich traten jeweilen die typischen Differenzen hervor: Infolge der „Durchwachsung" der Fruchthypheu (Schostakowitsch, a. a. O.) erhielten die oberflächlichen Rasen ein kraus-wolliges Aussehen. Nur anfänglich war olivgrüne Färbung zu beobachten, sehr bald ging sie über in ein schmutziges Grau. Die untergetauchten Teile wurden auch hier mit zunehmendem Alter fast schwarz.

Keiner der 4 Pilze machte jemals den Eindruck des Hungerns, wie er auf ungenügenden Nährlösungen an andern Formen zu beobachten ist. An Üppigkeit des Wachstums standen sie kaum hinter den gut mit Pepton und Rohrzucker genährten Kulturen von *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* zurück, während diese beiden Pilze dem äußeren Scheine nach auf der von absichtlichen Stickstoffzusätzen freien Lösung nur ein kümmerliches Dasein fristeten (vergl. die im Anhang mitgeteilten analytischen Daten über *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum*).

Auch wenn zu der gewöhnlichen „stickstofffreien" Lösung Zusätze von 0,5—1,0% Kalisalpeter gefügt wurden, erfolgte nur eine sehr geringe Steigerung des Wachstums. Agarplatten mit Zusätzen von je 1% Pepton, Asparagin, Ammoniumsulfat oder Natriumnitrat,

welche zur Prüfung auf Bakterienreinheit aus einer Reihe kleiner Kulturen mit den verschiedenen Pilzen geimpft wurden, ergaben kein erheblich stärkeres Wachstum. Das Anwachsen erfolgte sogar eher langsamer als in den gewöhnlichen Platten ohne besondern Stickstoffzusatz.

Aus dem bis jetzt Mitgeteilten ergibt sich als Resultat: **Die 4 Pilze *Alternaria tenuis, Macrosporium commune, Hormodendron cladosporioïdes* und *Cladosporium herbarum* sind befähigt zum normalen Wachstum auf einem Substrat, dem Stickstoffverbindungen nicht absichtlich zugesetzt sind, und unter Bedingungen, welche eine Absorption flüchtiger Stickstoffverbindungen aus der Luft beinahe undenkbar erscheinen lassen.**

Durch diese Tatsache darf man sich nicht, wie J. Vogel (S. 175) sich ausdrückt, „zur Annahme einer Stickstoffassimilation verleiten lassen“ [1]). Die Assimilation des elementaren Stickstoffs ist nur eine der beiden Erklärungsmöglichkeiten. Es wäre auch denkbar, daß die geringen, bei den Kulturen als Verunreinigungen sicher nicht ganz ausgeschlossenen Mengen von gebundenem Stickstoff den sehr anspruchslosen Pilzen ihr ergiebiges Wachstum gestatteten.

Darüber, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, kann einzig die Feststellung der Stickstoffbilanz entscheiden, deren Darstellung der folgende Abschnitt gewidmet ist.

B. Quantitative Untersuchungen über die Stickstoffbindung.

Die im folgenden angegebenen Stickstoffwerte wurden alle nach einer Modifikation der Kjeldahlschen Methode gewonnen, wie sie im Laboratorium des Kantonschemikers von Basel-Stadt, Herrn Prof. Dr. H. Kreis, für Stickstoffbestimmungen verwendet wird. Für die liebenswürdige Einführung in diese Methode bin ich Frl. Dr. Ch. Ternetz zu großem Dank verpflichtet.

Zur Oxydation verwendete ich ein Gemisch von 20 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure mit 1 g kristallisiertem Kupfersulfat und 8 g kristallisiertem Kaliumsulfat. Die Oxydation wurde fortgesetzt bis

---

1) Vogel (a. a. O.) macht dies den Autoren zum Vorwurf, welche bei Schimmelpilzen Stickstoffbindung gefunden haben. Dagegen muß betont werden, daß es sich bei den von ihm zitierten Autoren — Berthelot fehlt in seiner Aufzählung — um Folgerungen aus analytischen Daten und nicht um bloße „Annahme“ handelt. Auf dieser Stufe der „Annahme“ scheint es zu stehen, wenn man wie Vogel die Brefeldschen Untersuchungen als Gegenbeweise ansieht.

zur völligen Klärung des Kolbeninhalts. Nach dem Erkalten wurde dieser, meist zu einer bläulichweißen Masse erstarrt, mit ca. 200 ccm destilliertem Wasser quantitativ in einen stets peinlich sauber gehaltenen Kupferkolben übergeführt und unter Zusatz von 100 ccm 30proz. Natronlauge und von wenig Zink (zur Verminderung des „Stoßens") durch ein Kühlrohr in ein abgemessenes Quantum (meist ca. 10 ccm) entsprechend verdünnter, nahezu $^1/_{10}$ normaler Schwefelsäure überdestilliert. Durch Zurücktitrieren mit Natronlauge (mit Methylorange als Indikator) ergab sich nach einigen Reduktionsrechnungen der Stickstoffgehalt der untersuchten Probe vermehrt um denjenigen der zur Analyse benützten Reagenzien. Dieser letztere wurde für jede neue Portion von konzentrierter Schwefelsäure in mindestens 2 „blinden Versuchen" bestimmt unter Innehaltung genau gleicher Reagenzienmengen wie bei den Analysen. Alle als Stickstoffgehalte angegebenen Zahlen sind durch Berücksichtigung dieser „blinden Versuche" gewonnen. Der Titer der Maßflüssigkeiten wurde vor und nach jeder Analysenreihe sorgfältig in mehreren Parallelbestimmungen ermittelt.

Bei der Analyse einer großen Kultur mit 100 ccm Nährlösung wurde folgendermaßen verfahren:

Die Nährlösung wurde vom Mycel möglichst vollständig durch ein gewogenes Filter abgegossen, das Mycel selbst im Kulturkolben mit destilliertem Wasser (entweder frisch hergestellt oder aufgekocht) ausgewaschen und schließlich, nachdem das Waschwasser ebenfalls durch das Filter abgegossen war, auf das Filter gegeben. Zur Beschleunigung der Filtration mußte stets abgesaugt werden. Mycel und Filter wurden bei 100° getrocknet, gewogen und dann auf Stickstoff analysiert. Das Filtrat wurde auf ein bestimmtes Volumen, meist 200—250 ccm gebracht; von der so erhaltenen Lösung dienten Portionen von 25 und 50 ccm zur Stickstoffbestimmung, aus deren Ergebnis nach Abzug des „blinden Versuches" durch Multiplikation der Stickstoff im Gesamtfiltrat gefunden wurde. Das Gesamtfiltrat zu analysieren, war nicht möglich. Bei einer Reihe von Kulturen mußte ein Teil zu Dextrosebestimmungen erhalten bleiben, und zudem beanspruchte schon die Oxydation von 50 ccm ca. $2^1/_2$proz. Dextroselösung im günstigsten Fall $1^1/_2$ bis 2 Stunden, häufig deren 3, sodaß an die Analyse größerer Mengen nicht zu denken war, wenn diese auch eine weit größere absolute Genauigkeit im Endresultat ergeben hätte.

Bei den steril gehaltenen Nährlösungen gestaltete sich die Untersuchung gleich wie bei den von den Mycelien abfiltrierten Nährlösungen.

Ich muß darauf verzichten, alle Analysen ausführlich anzugeben, da die Übersichtlichkeit der Resultate bei einer derartigen mit Zahlen überladenen Darstellung allzu sehr leiden würde. Als Beispiele teile ich im folgenden zunächst die vollständigen Protokolle zweier Analysen mit, neben den zur Berechnung der Resultate nötigen Titerbestimmungen und „blinden Versuchen".

Titerbestimmungen[1]).

Zur Umrechnung der abgelesenen Volumina von Schwefelsäure und Natronlauge auf $^1/_{10}$ normale Säure resp. Lauge dienten die Ergebnisse folgender Bestimmungen:

a) Für die „blinden Versuche" und für die Stickstoffbestimmungen in „Mycel + Filter".

Es wurden 22,53 ccm $^1/_{10}$ normaler Lösung von Kaliumtetraoxalat in 3 parallelen Bestimmungen neutralisiert durch

22,70 ccm NaOH; 1 ccm NaOH entsprach also 0,9925 ccm $^1/_{10}$ n. NaOH
22,80 „ „ 1 „ „ „ „ 0,9882 „ „ „
22,78 „ „ 1 „ „ „ „ 0,9899 „ „ „
1 ccm NaOH entsprach also im Durchschnitt **0,9899** ccm $^1/_{10}$ n. NaOH.

Von der gleichen Natronlauge waren nötig zur Neutralisation

von 25,00 ccm H_2SO_4 . . . . 22,00 ccm, von 1 ccm H_2SO_4 also 0,8800 ccm
„ 25,02 „ „ . . . . 22,02 „ „ 1 „ „ „ 0,8800 „
„ 25,01 „ „ . . . . 22,02 „ „ 1 „ „ „ 0,8804 „
im Durchschnitt 0,8801 „

1 ccm H_2SO_4 entsprach also im Durchschnitt **0,8746** ccm $^1/_{10}$ n. H_2SO_4
(= 0,8801 × 0,9899).

b) Für die Stickstoffbestimmungen in den abfiltrierten Lösungen.

Es wurden 25,00 ccm $^1/_{10}$ normaler Lösung von Kaliumtetraoxalat in 2 parallelen Bestimmungen neutralisiert durch

25,12 ccm NaOH; 1 ccm NaOH entsprach also 0,9952 ccm $^1/_{10}$ n. NaOH
25,09 „ „ 1 „ „ „ „ 0,9964 „ „ „
1 ccm NaOH entsprach also im Durchschnitt **0,9958** ccm $^1/_{10}$ n. NaOH.

---

1) Die Anwendung der sehr bequemen Einstellung der Natronlauge mit Kaliumtetraoxalat verlangte Phenolphthaleïn als Indikator, während zur Einstellung der Säure auf die Lauge mit Methylorange gearbeitet wurde. Bei ausschließlicher Verwendung von Phenolphthaleïn zur Titerbestimmung würden sich nach Kontrollbestimmungen sämtliche Werte für die Stickstoffgehalte sogar noch etwas (um wenige Hundertstel Milligramme) höher stellen, als sie im folgenden verzeichnet sind.

Von der gleichen Natronlauge waren nötig zur Neutralisation

von 25,00 ccm H_2SO_4 . . . . 23,16 ccm, von 1 cm H_2SO_4 also 0,9264 ccm
„ 25,00 „ „ . . . . 23,13 „ „ 1 „ „ „ 0,9252 „
„ 25,00 „ „ . . . . 23,13 „ „ 1 „ „ „ 0,9252 „
im Durchschnitt 0,9256 „

1 ccm H_2SO_4 entsprach also im Durchschnitt **0,9217** ccm $^1/_{10}$ n. H_2SO_4
(= 0,9256 × 0,9958).

„Blinde Versuche".

a) Mit den Reagenzien und einem leeren Filter:

Bei der Destillation vorgel. H_2SO_4	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Zur Titration verbrauchte NaOH	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. NaOH	Durch NH_3 neutralisierte $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Äquivalente Menge N[1])
10,00 ccm	8,74 ccm	8,28 ccm	8,19 ccm	0,55 ccm	0,77220 mg
10,00 „	8,74 „	8,20 „	8,11 „	0,63 „	0,88452 „

Mittlerer N-Gehalt von Filter + Reagenzien . . . . . **0,82836** mg
Abweichung des Mittelwertes von der Einzelbestimmung . . . . . ± 0,05616 „

b) Mit den Reagenzien allein:

Bei der Destillation vorgel. H_2SO_4	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Zur Titration verbrauchte NaOH	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. NaOH	Durch NH_3 neutralisierte $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Äquivalente Menge N
10,02 ccm	8,75 ccm	8,30 ccm	8,21 ccm	0,54 ccm	0,75816 mg
10,00 „	8,74 „	8,35 „	8,26 „	0,48 „	0,67392 „

Mittlerer N-Gehalt der bei einer Analyse verwendeten Reagenzien . . **0,71604** mg
Abweichung des Mittelwertes von der Einzelbestimmung . . . . . ± 0,04212 „

Analyse der Kultur von *Alternaria*.

Datum der Impfung: 16. Februar 1907.
Datum der Untersuchung: 30. März 1907.
Alter der Kultur: 42 Tage.

a) Trockengewichtsbestimmung:

Gewicht von Mycel + Filter + Wägglas . . 12,4316 g
Gewicht von Filter + Wägglas . . . . . 12,2861 „
Gewicht des Mycels . . . . . **0,1455** „

b) Stickstoffbestimmung in Mycel + Filter:

Bei der Destillation vorgel. H_2SO_4	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Zur Titration verbrauchte NaOH	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. NaOH	Durch NH_3 neutralisierte $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Äquivalente Menge N
10,00 ccm	8,74 ccm	7,50 ccm	7,42 ccm	1,32 ccm	1,85328 mg

N-Gehalt von Mycel + Filter + Reagentien . . . . . **1,85328** mg

1) 1 ccm $^1/_{10}$ n. H_2SO_4 ist äquivalent 1,404 mg N.

c) Stickstoffbestimmung in 25 ccm des auf 200 ccm gebracht. Filtrats:

Bei der Destillation vorgel. H_2SO_4	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Zur Titration verbrauchte NaOH	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. NaOH	Durch NH_3 neutralisierte $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Äquivalente Menge N
10,00 ccm	9,21 ccm	8,33 ccm	8,29 ccm	0,92 ccm	1,29168 mg
10,00 „	9,21 „	8,38 „	8,34 „	0,87 „	1,22148 „

Mittlerer N-Gehalt von 25 ccm Filtrat + Reagenzien . . . . . **1,25658** mg
Abweichung des Mittelwertes von der Einzelbestimmung . . . . . ± 0,03510 „

d) Zusammenstellung der Resultate:

Trockengewicht des Mycels . . . 145,5 mg

N in 25 ccm Filtrat + Reagenzien 1,25658 ± 0,03510 mg
N in den Reagenzien . . . . . 0,71604 ± 0,04212 „
N in 25 ccm Filtrat . . . . . 0,54054 ± 0,07722 „
N im Gesamtfiltrat . . . . $8 \times (0{,}54054 \pm 0{,}07722) = \mathbf{4{,}32432} \pm 0{,}61776$ mg
N in Mycel + Filter + Reagenzien 1,85328 mg
N in Filter + Reagenzien . . . 0,82836 ± 0,05616 mg
N im Mycel . . . . $1{,}85328 - 0{,}82836 \pm 2 \times 0{,}05616 = \mathbf{1{,}02492} \pm 0{,}11232$ mg
Gesamt-N in der Kultur . . **5,34924** ± 0,73008 mg

Analyse der Kultur von *Macrosporium*.

Datum der Impfung: 16. Februar 1907.
Datum der Untersuchung: 30. März 1907.
Alter der Kultur: 42 Tage.

a) Trockengewichtsbestimmung:

Gewicht von Mycel + Filter + Wägglas . . 16,4175 g
Gewicht von Filter + Wägglas . . . . . 16,3043 „
Gewicht des Mycels . . . . . **0,1132** g

b) Stickstoffbestimmung in Mycel + Filter:

Bei der Destillation vorgel. H_2SO_4	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Zur Titration verbrauchte NaOH	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. NaOH	Durch NH_3 neutralisierte $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Äquivalente Menge N
10,00 ccm	8,74 ccm	7,58 ccm	7,50 ccm	1,24 ccm	1,74096 mg

N-Gehalt von Mycel + Filter + Reagenzien . . . . . **1,74096** mg

c) Stickstoffbestimmung in 25 ccm des auf 200 ccm gebracht. Filtrats:

Bei der Destillation vorgel. H_2SO_4	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Zur Titration verbrauchte NaOH	Umgerechnet auf $^1/_{10}$ n. NaOH	Durch NH_3 neutralisierte $^1/_{10}$ n. H_2SO_4	Äquivalente Menge N
10,00 ccm	9,21 ccm	8,35 ccm	8,31 ccm	0,90 ccm	1,26360 mg
10,00 „	9,21 „	8,32 „	8,28 „	0,93 „	1,30572 „

Mittlerer N-Gehalt von 25 ccm Filtrat + Reagenzien . . . . . **1,28466** mg
Abweichung des Mittelwertes von der Einzelbestimmung . . . . . ± 0,02106 „

d) Zusammenstellung der Resultate:

Trockengewicht des Mycels . . .	**113,2** mg
N in 25 ccm Filtrat + Reagenzien	1,28466 ± 0,02106 mg
N in den Reagenzien	0,71604 ± 0,04212 „
N in 25 ccm Filtrat	0,56862 ± 0,06318 „
N im Gesamtfiltrat	8 × (0,56862 ± 0,06318) = **4,54896** ± 0,50544 mg
N in Mycel + Filter + Reagenzien	1,74096 mg
N in Filter + Reagenzien . . .	0,82836 ± 0,05616 mg
N im Mycel. . . .	1,74096 — 0,82836 ± 2 × 0,05616 = **0,91260** ± 0,11232 mg
Gesamt-N in der Kultur . .	**5,46156** ± 0,61776 mg

Der Zusammenstellung der Analysenresultate habe ich noch einige Bemerkungen vorauszuschicken:

1. Sämtliche Gewichte sind in Milligrammen angegeben. Die Stickstoffgehalte sind aus den durch die Rechnung gefundenen 5—6stelligen Werten auf 2 Dezimalen abgerundet worden, da schon aus theoretischen Gründen bei einer Einzelbestimmung die zweite Stelle nach dem Komma nicht mehr sicher sein kann.

2. Es sind jeweilen 3 Zahlen übereinander angegeben. Sie haben folgende Bedeutung: Die mittlere, großgedruckte Zahl stellt einen wahrscheinlichsten Mittelwert dar, die obere einen möglichen, aber unwahrscheinlichen größten, die untere einen möglichen, aber unwahrscheinlichen kleinsten Wert. Bei den Kulturen vom 16. Februar 1907 wurden diese Grenzwerte durch Berücksichtigung der in den beiden Beispielen angeführten Abweichungen hergeleitet. Aus den an diesen und an zwei weiteren gleichzeitigen Analysen, die im Anhang mitgeteilt sind, beobachteten Abweichungen ergab sich ein Mittelwert (± 0,10 (179)), aus dem dann für die übrigen Analysen durch Rechnung gleichfalls Grenzwerte abgeleitet wurden[1]).

3. Die kleinen Kulturen von *Macrosporium* und von *Cladosporium*, beide vom 11. Juli 1906, wurden in toto analysiert, sodaß in der tabellarischen Zusammenstellung nur der „Gesamt-N der Kultur" angegeben werden konnte.

---

1) Nur für den „N im Mycel" konnten die Abweichungen von 0,11 direkt herübergenommen werden. Für den „N im Filtrat" mußten sie aus dem angegebenen Mittelwert berechnet werden, da bei der Untersuchung der Kulturen vom 25. August 1906 u. a. zum Teil andere Verdünnungsverhältnisse vorlagen.

A. Stickstoffgehalte der Kulturen.

1. *Alternaria tenuis.*

Art und Alter der Kultur	Trockengewicht des Mycels	N im Mycel	N im Filtrat	Gesamt-N der Kultur
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 6. XI. 05, untersucht 6. VI. 06 Alter: 212 Tage	287,5	0,54 0,43 0,32	5,15 4,84 4,53	5,69 5,27 4,85
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 15. XII. 06 Alter: 112 Tage	125,3	1,18 1,07 0,96	1,64 1,23 0,82	2,82 2,30 1,78
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 30. III. 07 Alter: 42 Tage	145,5	1,13 1,02 0,91	4,93 4,32 3,71	6,06 5,34 4,62

2. *Macrosporium commune.*

Art und Alter der Kultur	Trockengewicht des Mycels	N im Mycel	N im Filtrat	Gesamt-N der Kultur
Kleine Kultur in 25 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 11. VII. 06, untersucht: 10. VIII. 06 Alter: 30 Tage				0,48 0,38 0,28
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 20. XII. 06 Alter: 117 Tage.	90,6	1,09 0,98 0,87	3,39 2,88 2,37	4,48 3,86 3,24
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 30. III. 07 Alter: 42 Tage	113,2	1,02 0,91 0,80	5,05 4,55 4,05	6,07 5,46 4,85

3. *Hormodendron cladosporioïdes.*

Art und Alter der Kultur	Trockengewicht des Mycels	N im Mycel	N im Filtrat	Gesamt-N der Kultur
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 6. XI. 05, untersucht: 30. V. 06 Alter: 205 Tage	156,8	2,31 2,20 2,09	0,53 0,22 ?	2,84 2,42 2,00
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 8. XII. 06 Alter: 105 Tage	177,0	1,36 1,25 1,14	3,39 2,88 2,37	4,75 4,13 3,51
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 27. III. 07 Alter: 39 Tage	191,8	1,05 0,94 0,83	2,36 1,18 0,00	3,41 2,12 0,83

4. *Cladosporium herbarum.*

Art und Alter der Kultur	Trocken-gewicht des Mycels	N im Mycel	N im Filtrat	Gesamt-N der Kultur
Kleine Kultur in 50 ccm mit 2% Dextrose		0,39	2,98	3,37
Geimpft: 13. V. 05, untersucht: 5. VII. 05	70,0	0,28	2,60	2,88
Alter: 53 Tage		0,17	2,22	2,49
Kleine Kultur in 25 ccm mit 5% Dextrose				1,13
Geimpft: 11. VII. 06, untersucht: 9. VIII. 06				1,03
Alter: 29 Tage				0,93
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose		1,44	1,70	3,14
Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 8. XII. 06	155,1	1,33	1,19	2,52
Alter: 105 Tage		1,22	0,68	1,90
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose		1,02	3,36	4,38
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 27. III. 07	98,5	0,91	2,80	3,71
Alter: 39 Tage		0,80	2,24	3,04

B. Stickstoffgehalt steriler Nährlösungen verschiedenen Alters

(zu je 100 ccm in gleichgroßen Kolben wie die Kulturen aufbewahrt).

Alter der Nährlösung	N in 25 ccm der Lösung	N in 50 ccm der Lösung	N in 100 ccm der Lösung
Datum der Herstellung: 14. III. 07	0,29	0,58	1,16
Datum der Untersuchung: 19. III. 07	0,25	0,50	1,00
Alter der Lösung: 5 Tage	0,21	0,42	0,84
Datum der Herstellung: 14. III. 07	0,30	0,60	1,20
Datum der Untersuchung: 6. V. 07	0,22	0,44	0,88
Alter der Lösung: 53 Tage	0,14	0,28	0,56
Datum der Herstellung: 14. III. 07	0,36	0,72	1,44
Datum der Untersuchung: 14. V. 07	0,28	0,56	1,12
Alter der Lösung: 61 Tage	0,20	0,40	0,80
Datum der Herstellung: 15. IV. 07	0,26	0,52	1,04
Datum der Untersuchung: 16. V. 07	0,23	0,46	0,92
Alter der Lösung: 31 Tage	0,20	0,40	0,80

Die Zahlen der ersten Kolonne wurden gefunden durch Stickstoffbestimmungen in 50 ccm der auf 200 ccm gebrachten Lösung, die Zahlen der beiden anderen Kolonnen wurden aus denen der ersten durch Rechnung ermittelt.

Die Zusammenstellung B ergibt:

1. Eine Zunahme des Stickstoffgehaltes steriler Nährlösungen findet bei längerem Stehen in dem vor flüchtigen Stickstoffverbindungen geschützten Raum nicht statt.

2. Nährlösungen verschiedener Herstellung zeigen gleiche Stickstoffgehalte.

Die aus der Tabelle sich ergebenden arithmetischen Mittel dürfen also aufgefaßt werden als Anfangs-Stickstoffgehalte der zu den Kulturen benützten Nährlösungen gleicher Zusammensetzung.

Aus der Tabelle folgt als

Mittlerer Anfangs-N-Gehalt von	0,30	
25 ccm Nährlösung mit 5%	0,24	mg
Dextrose	0,18	
Mittlerer Anfangs-N-Gehalt von	0,60	
50 ccm Nährlösung mit 5%	0,45	mg
Dextrose	0,36	
Mittlerer Anfangs-N-Gehalt von	1,20	
100 ccm Nährlösung mit 5%	0,96	mg
Dextrose	0,72	

In den folgenden 4 Tabellen sind diese Mittelwerte mit den Endstickstoffgehalten der Kulturen verglichen. In diesen Tabellen sind gewonnen: die mittleren (großgedruckten) Zahlen durch Subtraktion der mittleren Anfangs- von den mittleren End-Stickstoffgehalten, die oberen durch Subtraktion der kleinsten Anfangs- von den größten Endgehalten, die unteren durch Subtraktion der größten Anfangs- von den kleinsten Endgehalten.

1. *Alternaria tenuis.*

Art und Alter der Kultur	Anfangs-N	End-N	N-Zunahme
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	5,69	4,97
Geimpft: 6. XI. 05, untersucht: 6. VI. 06	0,96	5,27	4,31
Alter: 212 Tage	0,72	4,85	3,65
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	2,82	2,10
Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht 15. XII. 06	0,96	2,30	1,34
Alter: 112 Tage	0,72	1,78	0,58
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	6,06	5,34
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 30. III. 07	0,96	5,34	4,38
Alter: 42 Tage	0,72	4,62	3,32

2. *Macrosporium commune.*

Art und Alter der Kultur	Anfangs-N	End-N	N-Zunahme
Kleine Kultur in 25 ccm mit 5% Dextrose	0,30	0,48	0,30
Geimpft: 11. VII. 06, untersucht: 10. VIII. 06	0,24	0,38	0,14
Alter: 30 Tage	0,18	0,28	— 0,02
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	4,48	3,76
Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 20. XII. 06	0,96	3,86	2,90
Alter: 117 Tage	0,72	3,24	2,04
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	6,07	5,35
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 30. III. 07	0,96	5,46	4,50
Alter: 42 Tage	0,72	4,85	3,65

3. *Hormodendron cladosporioïdes.*

Art und Alter der Kultur	Anfangs-N	End-N	N-Zunahme
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	2,84	2,12
Geimpft: 6. XI. 05, untersucht: 30. V. 06	0,96	2,42	1,46
Alter: 205 Tage	0,72	2,00	0,80
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	4,75	4,03
Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 8. XII. 06	0,96	4,13	3,17
Alter: 105 Tage	0,72	3,51	2,31
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	3,41	2,69
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 27. III. 07	0,96	2,12	1,16
Alter: 39 Tage	0,72	0,83	0,37

4. *Cladosporium herbarum.*

Art und Alter der Kultur	Anfangs-N	End-N	N-Zunahme
Kleine Kultur in 50 ccm mit 2% Dextrose	0,60	3,37	3,01
Geimpft: 13. V. 05, untersucht: 5. VII. 05	0,48	2,88	2,40
Alter: 53 Tage	0,36	2,49	1,89
Kleine Kultur in 25 ccm mit 5% Dextrose	0,30	1,13	0,95
Geimpft: 11. VII. 06, untersucht: 9. VIII. 06	0,24	1,03	0,79
Alter: 29 Tage	0,18	0,93	0,63
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	3,14	2,42
Geimpft: 25. VIII. 06, untersucht: 8. XII. 06	0,96	2,52	1,66
Alter: 105 Tage	0,72	1,90	0,70
Große Kultur in 100 ccm mit 5% Dextrose	1,20	4,38	3,66
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 27. III. 07	0,96	3,72	2,86
Alter: 39 Tage	0,72	3,04	1,84

Alle Kulturen der 4 Pilze ergeben also eine Zunahme an Stickstoff. Nur in zwei Fällen würde aus der Kombination der unwahrscheinlichen ungünstigsten Grenzwerte eine geringe Stickstoffabnahme folgen. Ich halte daher den Schluß für berechtigt:

Die 4 Pilze *Alternaria tenuis*, *Macrosporium commune*, *Hormodendron cladosporioïdes* und *Cladiosporium herbarum* sind als stickstoffbindende Organismen zum Wachstum auf sehr stickstoffarmem[1]) Substrat befähigt.

Die einzigen an sich berechtigten Einwände, die man dagegen erheben kann, sind die folgenden:

1. Die Nichtberücksichtigung der mit den Sporen eingeführten Stickstoffmengen.

Bei dem von mir befolgten Modus der Impfung war es von vornherein aussichtslos, auf analytischem Wege Aufschluß über diese Fehlerquelle zu erhalten. Ich impfte nicht, wie z. B. Saida, mit Sporenaufschwemmungen, sondern übertrug die Sporen direkt mit geradem Platindraht von der Ausgangskultur in die Nährlösung. Dabei handelt es sich um Sporenmassen, die sehr klein, aber von Fall zu Fall sehr verschieden sind. Daß dabei aber nicht Stickstoffmengen von einem bis mehreren Milligrammen in Frage kommen, geht schon aus dem Vergleich der kaum sichtbaren Sporenmassen am Impfdraht mit einem aus Platin (vom spezifischen Gewicht 21,3!!) gefertigten Milligrammgewicht mit Evidenz hervor. Wie hoch sich die bei der Impfung eingeführten Stickstoffmengen unter den denkbar unwahrscheinlichsten Annahmen möglicherweise belaufen könnten, mag die folgende Auseinandersetzung lehren:

An je 10 Sporen der 4 Pilze wurde Länge l und Dicke d gemessen. Zu den sich aus diesen Einzelmessungen für jeden Pilz ergebenden Maximal-, Mittel- und Minimalwerten wurden die Rauminhalte berechnet. Der Berechnung lag zugrunde die Formel für den Inhalt I eines Rotationsellipsoïds mit den Halbaxen

$$a = \frac{l}{2} \text{ und } b = c = \frac{d}{2} :$$

$$I = \frac{4}{3}\,\pi\,\frac{l}{2}\cdot\frac{d^2}{4} \text{ oder } I = \frac{1}{6}\,\pi\,l\,d^2$$

Sie ergab für *Macrosporium*, *Homodendron* und *Cladosporium* annähernd richtige, für *Alternaria* wegen der Flaschenform der Sporen etwas zu hohe Werte, was aber nur einer Übertreibung der Annahmen gleichkommt.

1) 0,96 mg N in 100 ccm Nährlösung entspricht einer Konzentration von nur 0,00096 %.

Aus dem Rauminhalt wurde der Stickstoffgehalt einer Spore berechnet unter folgenden, leicht als gewaltig übertrieben zu erkennenden Voraussetzungen:

Spezifisches Gewicht der Spore 1,5
Wassergehalt der Spore . . . . . 50 %
Rest des Frischgewichts sei Proteinsubstanz mit 16 % Stickstoffgehalt. Das Frischgewicht habe also einen Stickstoffgehalt von . . . . . 8 %

König verzeichnet für Pilze einen minimalen Wassergehalt von 70,8 % und einen maximalen Stickstoffgehalt der Trockensubstanz (!) von 8,8 %.

In untenstehender Tabelle sind angegeben: die Längen in μ, die Rauminhalte in μ^3 und die Stickstoffgewichte in einer Einheit, welche dem Gewicht von 1 μ^3 Wasser, d. h. also 0,000000001 mg, entsprechen.

Wertvoll sind besonders die Zahlen der zweitletzten Kolonne; Die sicher zu hohen Stickstoffgehalte von einer Million Sporen erreichen noch nicht das Gewicht von 1 mg!

	Länge der Spore	Dicke der Spore	Inhalt der Spore	N-Gehalt einer Spore	N-Gehalt von 1 Million Sporen in mg	1 mg N ist enthalten in ... Millionen Sporen
Alternaria	37,5	16,3	5217	626,04	0,626 040	1,597
	31,3	**13,5**	**2987**	**358,44**	**0,358 440**	**2,789**
	29,5	11,3	1839	220,68	0,220 680	4,531
Macrosporium	23,8	17,5	3816	457,92	0,457 920	2,184
	22,3	**15,0**	**2627**	**325,24**	**0,325 240**	**3,074**
	20,0	10,0	1047	125,64	0,125 640	7,959
Hormodendron	10,0	3,8	76	9,12	0,009 120	109,600
	7,3	**3,8**	**55**	**6,60**	**0,006 600**	**151,500**
	3,8	3,0	18	3,24	0,003 240	308,600
Cladosporium	11,3	5,8	199	23,88	0,023 880	41,870
	8,8	**4,8**	**106**	**12,72**	**0,012 720**	**78,610**
	4,5	3,8	34	4,08	0,004 080	245,100

Um mir ein Urteil über die Zahl der bei einer Impfung übertragenen Sporen zu verschaffen, brachte ich mit dem Platindraht

eine ungewöhnlich große Menge von *Alternaria*-Sporen (das Ende des Drahtes war auf etwa 0,5 cm vollständig geschwärzt) in einen Tropfen Wasser und legte nach gleichmäßiger Verteilung ein Deckglas auf. Mit Hilfe von Okularnetzmikrometer und Kreuztisch wurden etwas mehr als $^2/_3$ der ganzen Deckglasfläche abgezählt. Aus dem Resultat — 1744 — wurde durch Umrechnung unter beträchtlicher Aufrundung die Zahl von 2500 Sporen gefunden. Daß der Stickstoffgehalt dieser überaus großen, bei den Impfungen sicher nie erreichten Zahl weit hinter dem zurückbleibt, was analytisch irgendwie nachgewiesen werden kann, ist klar.

Die hohen Werte, die Saida (a. a. O.) als Stickstoffgehalte der Impfungen angibt — bei *Acrostalagmus cinnabarinus* 0,4438 mg — erklären sich nur aus dem Arbeiten mit ungemein sporenreichen Aufschwemmungen.

2°. Der Stickstoff findet sich in der sterilen Nährlösung in einer der benützten Bestimmungsmethode unzugänglichen, aber durch den Pilz verwertbaren Form.

Dieser bei der Untersuchung der sterilen Lösung nicht gefundene Stickstoff (Stickoxyde oder deren Hydrate, Nitroverbindungen u. a.) wird vom Pilz in die nach Kjeldahl bestimmbare Form des Eiweiß-Stickstoffes übergeführt. Nun muß aber auf Grund der Darstellungsart der Dextrose, des unreinsten und zugleich quantitativ dominierenden Bestandteiles der Nährlösung, angenommen werden, daß die Hauptmasse der stickstoffhaltigen Verunreinigungen von Eiweißkörpern oder von deren Spaltungsprodukten gebildet wird, und daß nur ein relativ geringer Anteil aus Körpern besteht, deren Stickstoffgehalt nicht nach Kjeldahl bestimmt werden kann.

Durch die Gegenwart des Traubenzuckers in der zur Oxydation mit konzentrierter Schwefelsäure benützten Lösung würden aber offenbar diese Körper ebenfalls nach der Kjeldahlschen Methode bestimmbar werden (vgl. über die Methode von Asboth: Fresenius, S. 734). Eine Unrichtigkeit der Stickstoffbestimmung in der sterilen Nährlösung ist somit ausgeschlossen. Der prinzipiell zulässige zweite Einwand hat in dem hier vorliegenden Fall keine Bedeutung.

Es ist in Anbetracht der schon wiederholt erwähnten abschätzigen Kritik, welche die ähnlichen Resultate Anderer erfahren haben, nicht überflüssig, auf einige der dabei immer wiederkehrenden Bedenken kurz einzutreten. Wohl die detaillierteste Aufzählung

gibt uns Berthold Heinze (S. 41)[1]: Außer der Nichtberücksichtigung der geimpften Sporenmengen, deren Belanglosigkeit ich für meinen Fall bereits dargelegt habe, bleiben noch übrig „von etwa möglichen Fehlerquellen“:

1. „relativ kleine zu Stickstoffbestimmungen verwendete Mengen Kulturflüssigkeit;

2. „die verschiedenen möglichen Fehler bei der Ausführung der Stickstoffbestimmungen selbst;

3. „der teilweise sehr hohe Zuckergehalt in seiner eventuellen Beeinflussung der Bestimmungsmethode;

4. „die möglichen Unterschiede bei Kontrollbestimmungen, . .

5. „etwaige nicht ausgeschlossene Rechnungsfehler.“

1. und 3. sind als Fehlerquellen eliminiert durch die Ausführung paralleler Bestimmungen in steriler und in bewachsener Nährlösung. Beide müßten in gleichem Sinne durch die unter 1. und 3. genannten Umstände beeinflußt werden, sodaß am Wert ihrer Differenz nichts geändert wird.

2. und 4. verlieren ihre für das Resultat verhängnisvolle Bedeutung durch die Anführung der Grenzwerte neben dem Mittelwert. Auch die unwahrscheinliche Kombination der größten Anfangs- mit den kleinsten Endgehalten liefert völlig gleichsinnige Resultate wie die alleinige Benützung der Mittelwerte. Die beiden bereits erwähnten Ausnahmen, deren eine sich zudem auf eine 25 ccm-Kultur bezieht, vermögen die Richtigkeit der in den Tabellen auf S. 21 u. S. 22 niedergelegten Resultate nicht zu erschüttern.

„Gelegentliche“ Rechnungsfehler sind natürlich nie ganz ausgeschlossen; daß aber durch sie die Resultate ganzer Analysenreihen gleichsinnig beeinflußt werden sollten, wird niemand wahrscheinlich machen wollen.

Nach alledem bleibt die Richtigkeit des S. 23 formulierten Schlusses bestehen.

Zum Schlusse dieses Abschnittes seien die relativen und absoluten Stickstoffmengen, um die es sich bei den mitgeteilten Untersuchungen handelt, einer kurzen Betrachtung unterworfen.

Vergleicht man die Trockengewichte und Stickstoffzunahmen verschieden alter Kulturen, so wird man finden, daß eine regelmäßige Steigerung beider mit zunehmendem Alter in den von mir

---

1) Heinze vergißt aber, seine Kritik auch auf die Angaben anzuwenden, welche nach ihm und anderen die Unzuverlässigkeit der angefochtenen Resultate erweisen sollen.

untersuchten Kulturen nicht stattfindet. So hat z. B. die 212 Tage alte Kultur von *Alternaria* allerdings mehr Trockengewicht gebildet und mehr Stickstoff gebunden als die nur 112 Tage alte Kultur. Die bloß 43 tägige Kultur übertrifft die 112tägige aber beinahe ebenso sehr wie die 212tägige an Trockengewicht und an gebundenem Stickstoff. Ähnliche Unregelmäßigkeiten zeigen alle anderen Pilze. Alle diese Differenzen von Kultur zu Kultur finden ihre natürliche Erklärung in den Verschiedenheiten der eingeimpften Sporenmenge und in der verschiedenartigen Verteilung der Sporen in der Flüssigkeit. Eine reichliche Impfung läßt eine größere Trockenernte voraussehen, bei dichterer Zusammenlagerung der Sporen (und damit auch der auswachsenden Hyphen) sind die Lebensbedingungen durch die Konkurrenz verschlechtert. Durch Zusammenhalten der zahlreichen in dieser Hinsicht bestehenden Möglichkeiten werden die beobachteten Unregelmäßigkeiten im Verhalten der einzelnen Kulturen leicht verständlich.

Es ist natürlich unter diesen Umständen schwer, die 4 Pilze nach ihrer „stickstoffbindenden Kraft“ in eine Rangordnung zu setzen. Verwertet man die Durchschnitte der großen Kulturen in 100 ccm, so erhält man die folgende Reihe:

Macrosporium	3,70 mg
Alternaria	3,34 „
Cladosporium	2,26 „
Hormodendron	1,93 „

Sie hat bei der mangelhaften Vergleichbarkeit dieser Durchschnitte keine unbedingte Zuverlässigkeit.

Auffällig ist die Tatsache, daß bei fast allen Kulturen der Stickstoffgehalt der abfiltrierten Lösungen denjenigen des getrockneten Mycels beträchtlich übersteigt. Sie ist wohl zur Hauptsache zurückzuführen auf die Ausscheidung stickstoffhaltiger Stoffwechselprodukte durch die Pilzhyphen. Einen nach den Erörterungen von S. 23 u. ff. jedenfalls nur geringen Anteil am Stickstoffgehalt der Filtrate dürften die auch von den Filtern nicht zurückgehaltenen Sporen liefern. Daß Sporen die Filter passierten, ließ sich an dem Anwachsen kleiner Mycelien in nicht mehr gebrauchten Resten der Filtrate feststellen.

In der folgenden Tabelle sind in % der zugehörigen Trockengewichte angegeben:

a) die Stickstoffgehalte der Trockensubstanz;
b) die Gesamtstickstoffgehalte der Kulturen;
c) die Mengen des assimilierten Stickstoffs.

(Die beiden in toto analysierten Kulturen von *Macrosporium* und *Cladosporium* sind darin begreiflicherweise nicht berücksichtigt.)

Pilz:	Alter der Kulturen in Tagen	N im Mycel	Gesamt-N der Kultur	Assimilierter N
Alternaria	212	0,15	1,83	1,50
	112	0,85	1,84	1,07
	42	0,70	3,67	3,01
Macrosporium	117	1,08	4,26	3,20
	42	0,80	4,82	3,97
Hormodendron	205	1,40	1,54	0,93
	105	1,71	2,33	1,79
	39	4,90	1,10	0,60
Cladosporium	53	0,40	4,11	3,43
	105	0,86	1,63	1,07
	39	0,92	3,78	2,90

Auch hieraus lassen sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen des gleichen Pilzes deutlich erkennen. Aus dem Vergleich der Zahlen der letzten Reihe ist zu ersehen, daß die älteren Kulturen im Verhältnis zur gebildeten Trockensubstanz weniger Stickstoff assimiliert haben, als die jüngeren Kulturen. Ein konstantes Verhältnis von Trockengewicht und assimiliertem Stickstoff besteht also nicht.

Daß die Stickstoffgehalte und Stickstoffzunahmen in den Kulturen im Verhältnis zu den Trockengewichten geringe sind, stimmt recht gut überein mit dem Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung der Pilzmycelien.

Nach Fixierung und Färbung ließen sich nur in den äußersten Spitzen der Hyphen reichliche Protoplasmamassen beobachten, in den älteren Hyphenteilen finden sich nur noch zarte Stränge und Lamellen von Protoplasma zwischen den das Zellumen erfüllenden Fettkugeln. (Davon, daß die stark lichtbrechenden, glänzenden Kugeln wirklich Fett, und nicht etwa ein glykogenartiges Kondensationsprodukt darstellten, habe ich mich durch Lösungsversuche mit Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Äther, Benzol und Xylol über-

zeugt; sie ergaben alle positives Resultat, während Glykogenreaktionen, wie Jodfärbung und Hydrolyse gänzlich versagten.) In zahlreichen Zellen läßt sich aber Protoplasma überhaupt nicht mehr sichtbar machen. Daß dabei die Gesamttrockensubstanz eines Mycels prozentualiter nur wenig Stickstoff enthalten kann, liegt klar.

Es erübrigt noch, die in diesem Abschnitte mitgeteilten Zahlenresultate mit denen anderer Autoren zu vergleichen, soweit sich dies überhaupt durchführen läßt.

1. Quantität des assimilierten elementaren Stickstoffs. Nur für 2 meiner Versuchsobjekte, für *Alternaria tenuis* nnd *Hormodendron cladosporioïdes* liegen bis jetzt gleichsinnige Angaben vor. Berthelot erhielt bei *Alternaria* etwas höhere Stickstoffzunahmen als ich, Frank bei *Hormodendron* einen ähnlichen Wert, wie er hier mitgeteilt wurde. Die Vergleichbarkeit der Resultate ist aber durch die Ungleichartigkeit der Kulturbedingungen (Menge und Zusammensetzung der Nährlösung, Aufstellung und Gestalt der Kulturgefäße) stark beeinträchtigt. Dasselbe gilt für den Vergleich mit den an den Pilzen konstatierten Stickstoffzunahmen. Da an eine Umrechnung auf gleiches Alter der Kultur und auf gleiche Mengen von Nährlösung gar nicht zu denken ist, so können nur Durchnittswerte nebeneinander gehalten werden, ohne daß dabei die Bedingung des „ceteris paribus“ erfüllt wäre. Es seien darum auch bloß die in der historischen Einleitung angegebenen Durchschnitte den S. 27 mitgeteilten Durchschnittszahlen an die Seite gestellt. Eine Rangordnung kann daraus in keiner Weise konstruiert werden. Es ist darum auch die chronologische Reihenfolge beibehalten worden. Die für *Aspergillus niger* von verschiedenen Autoren aufgestellten Zahlen wurden absichtlich getrennt angeführt. Berücksichtigt wurden hier auch die im Anhang dieser Arbeit für *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* erwähnten Zahlen [1]).

Wir gewinnen den Eindruck, daß die Menge des gebundenen Stickstoffes je nach dem Zusammentreffen der nur zum Teil in der Hand des Experimentators liegenden Kulturbedingungen sehr verschieden ausfallen kann.

---

1) Als das Manuskript der vorliegenden Arbeit schon zum Drucke abgeliefert war, erschien in Bd. XLIV, Heft 3 der Jahrb. f. wiss. Bot. die neue, umfangreichere Arbeit von Ternetz, worin die Verfasserin die positiven Resultate ihrer Untersuchungen an 5 (wahrscheinlich neuen) *Phoma*-Arten niedergelegt hat. Dieser kurze Hinweis muß hier genügen.

Pilzform	Autor	Publikationsjahr	N-Zunahme im Durchschnitt mg	Zahl der Versuche	Bemerkungen[1])
Alternaria tenuis	Berthelot	1893	6,87	4	auf N-haltiger Lösung
	Der Verfasser	1908	3,34	3	„ N-armer „
Aspergillus niger	Berthelot	1893	7,34	5	auf N-haltiger Lösung
	Puriewitsch	1895	4,51	16	„ N-haltiger „
	Saida	1901	1,42	5	
	Verfasser (Anh.)	1908	1,42	1	„ N-armer „
Hormodendron cladosporioïdes	B. Frank	1893	3,5	1	auf N-freier Lösung
	Der Verfasser	1908	1,93	3	„ N-armer „
Penicillium glaucum	Puriewitsch	1895	3,26	5	auf N-haltiger Lösung
	Verfasser (Anh.)	1908	2,22	1	„ N-armer „
Phoma Betae	Saida	1901	0,85	4	auf N-freier Lösung
			3,33	12	„ N-haltiger „
Mucor stolonifer	Saida	1901	0,89	1	auf N-freier Lösung
			1,77	2	„ N-haltiger „
Endococcus purpurascens	Saida	1901	0,00	1	auf N-freier Lösung
			1,77	3	„ N-haltiger „
„*Oxycoccus*-Pilz“	Ternetz	1904	2,06	5	auf N-freier Lösung
Macrosporium commune	Der Verfasser	1908	3,70	2	auf N-armer Lösung
Cladosporium herbarum	Der Verfasser	1908	2,26	2	auf N-armer Lösung

2. Die relativen Stickstoffgehalte der Pilztrockensubstanz. Aus Königs (a. a. O.) Analysen von Fruchtkörpern von Asco- und Basidiomyceten ergibt sich als relativer Stickstoffgehalt der Trockensubstanz:

im Maximum . . . . . 8,88 %
im Minimum . . . . . 1,70 %
im Mittel . . . . . 4,83 %

Aus Czapek (I, S. 79) folgt als relativer Stickstoffgehalt für die Trockensubstanz von Hutpilzen:

im Maximum . . . . . 8,19 %
im Minimum . . . . . 1,18 %
im Mittel . . . . . 3,83 %

1) Als „N-frei“ wurde die Lösung bezeichnet, wenn weder qualitative noch quantitative Angaben über ihren N-Gehalt vorliegen, als „N-arm“, wenn keine besonderen N-Zusätze gemacht wurden, die Analysen aber einen geringen N-Gehalt ergaben.

Für Conidien von *Aspergillus oryzae* gibt Aso (zitiert bei Czapek I, S. 80) 6,38% als Stickstoffgehalt an.

Die Zahlen der zweiten Kolonne auf S. 28 liegen zum größten Teil unter dem von Czapek verzeichneten Minimum. Richtiger ist es vielleicht, aus dem auf S. 27 erörterten Grunde die relativen Mengen des assimilierten Stickstoffes zum Vergleich mit den Königschen und Czapekschen Werten zu benützen. Sie sind fast ausnahmslos höher als die im aufgefangenen Mycel bestimmten relativen Mengen, ja von der 42tägigen Kultur von *Macrosporium* wird der Czapeksche Mittelwert von 3,83% sogar überstiegen.

Wenn auch die relativen Stickstoffmengen bei *Alternaria*, *Macrosporium*, *Hormodendron* und *Cladosporium* im allgemeinen niedriger sind als die aus Czapek und König entnommenen Werte, so kann doch damit keineswegs nach dem Beispiel Vogels (a. a. O.) ein Argument gegen die Stickstoffbindung gewonnen werden. „Außerordentlich niedrig" erscheinen übrigens die Stickstoffgehalte stickstoffbindender Pilze Vogel hauptsächlich darum, weil er sie mit „in normaler Weise ernährten Bakterien" mit Stickstoffgehalten zwischen 10 und 12%, und nicht, wie es wohl einzig berechtigt ist, mit Pilzen verglichen hat.

Die zwischen meinen und den aus Czapek und König zitierten Zahlen bestehende Differenz verliert an Bedeutung, wenn man bedenkt, daß der Stickstoffgehalt der Fruchtkörper von Ascomyceten und Basidiomyceten nicht ohne weiteres auch bei Hyphomyceten erwartet werden darf. Ein hoher Stickstoffgehalt der Trockensubstanz bei stickstoffbindenden Hyphomyceten kann überhaupt gar nicht vorausgesehen werden, da die Bindung elementaren Stickstoffes den Aufbau der Eiweißkörper aller Wahrscheinlichkeit nach erheblich erschwert.

IV. Untersuchungen über einige formale Lebensbedingungen der stickstoffbindenden Pilze.

Von den formalen Lebensbedingungen bot die Kohlenstoffquelle das größte Interesse. Den Untersuchungen über die Eignung verschiedener organischer Verbindungen zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs und des Energieverbrauchs schicke ich die Resultate einer kleinen Zahl von Versuchen voraus, die über den Einfluß von Licht und Temperatur sowie über das Sauerstoffbedürfnis angestellt wurden.

A. Licht, Temperatur und Sauerstoff.

1. Licht. Da ich meine Pilze alle an Orten fand, an denen sie während des ganzen Tages sehr intensiv beleuchtet waren, so konnte vermutet werden, daß das Licht in irgend welcher Weise ihr Wachstum und damit auch die Stickstoffbindung beeinflusse. Zur Orientierung wurden im November 1906 folgende Versuche angestellt:

Von *Alternaria*, *Macrosporium*, *Hormodendron* und *Cladosporium* wurden je 4 kleine Kulturen (in 25 ccm) angelegt. Es wurden aufbewahrt:

die Kulturen I unter einer weißen Glasglocke in diffuser Beleuchtung im Institutsgewächshaus;

die Kulturen II unter Glasglocke, verdunkelt durch einen schwarz bezogenen Pappzylinder, im Dunkelzimmer;

die Kulturen III in einem Zinkkasten mit Blauscheibe;

die Kulturen IV in einem Zinkkasten mit Rotscheibe, III und IV in diffusem Licht neben I.

Die Versuche ergaben, daß weder die vegetative Entwicklung noch die Fruktifikation durch das Licht beeinflußt wurden. Alle 4 Pilze entwickelten im Dunkeln Mycel und Conidien ebenso gut wie in diffusem Licht beliebiger Qualität.

Die Angabe von Schostakowitsch (a. a. O.), es seien die Conidienträger von *Hormodendron* positiv heliotropisch, fand ich durch eine Wahrnehmung an einer Agarkultur bestätigt: Die Platte war mit starkem blauem, für das Auge völlig lichtdichtem Papier derart umschlossen, daß nur ein kleines Segment unbedeckt blieb. Die mikroskopische Beobachtung bei schwacher Vergrößerung ergab nach wenigen Tagen, daß die Conidienträger zum größten Teil nach diesem Ausschnitt hinneigten.

Bei den 3 anderen Formen waren solche heliotropische Erscheinungen nicht zu bemerken.

2. Temperatur. Alle 4 Pilze wurden vornehmlich im Herbst und während des Winters isoliert. Die Feststellung, ob auch bei verhältnismäßig niederen Temperaturen ein Wachstum stattfinde, und ob etwa eine Empfindlichkeit gegen sommerlich hohe Wärmegrade bestehe, war daher wünschenswert.

Am 6. November 1906 wurden daher folgende 3 Serien (zu je einer Kultur von *Alternaria*, *Macrosporium*, *Hormodendron* und *Cladosporium*) angesetzt:

Serie I im Thermostaten bei Temperaturen zwischen 27,0° und 28,0° (Mittelwert 27,5°);

Serie II im Versuchsgewächshaus unter Glasglocke bei Temperaturen zwischen 15° und 22° (Mittelwert 17,1°);

Serie III im Freien unter Eiskühlung in einem doppelwandigen Zinkkasten bei Temperaturen zwischen — 0,5° und 9,0° (Mittelwert 2,2°).

Der Zustand dieser 3 Serien am 4. Dezember 1906, also nach 28 Tagen, ist in der folgenden Tabelle registriert. Darin bedeutet:

3 reichliches Wachstum und reichliche Fruktifikation,
2 gutes Wachstum und deutliche Fruktifikation,
1 schwaches Wachstum ohne oder nur mit spärlicher Fruktifikation.

	Maximum . . 28,0° Minimum . . 27,0° Mittel . . . 27,5°	Maximum . . 22,0° Minimum . . 15,0° Mittel . . . 17,1°	Maximum . . 9,0° Minimum — 0,5° Mittel . . . . 2,0°
Alternaria tenuis	3	3	1
Macrosporium commune	3	3	1
Hormodendron cladosporioïdes	2	3	2
Cladosporium herbarum		3	2

Am besten gediehen alle 4 Pilze bei der mittleren Temperatur von 17,1° in Serie II. In Serie III, bei der mittleren Temperatur von nur 2,2° waren alle 4 Kulturen gehemmt, die von *Hormodendron* und *Cladosporium* merklich weniger als die der beiden anderen Formen. In Serie I, bei der relativ hohen Mitteltemperatur von 27,5° wuchsen *Alternaria* nnd *Macrosporium* ebenso gut wie in Serie II, *Hormodendron* war dagegen stark gehemmt. Die *Cladosporium*-Kultur in Serie I ist steril geblieben.

Als Parallele zu diesem experimentellen Ergebnis führe ich die Häufigkeit an, mit der ich die einzelnen Pilze zu den verschiedenen Jahreszeiten fand. Ich verweise dabei auf die Zusammenstellung am Schlusse des Abschnittes II. Die Isolierungen fielen zum größten Teil in das Sommersemester 1905 (April, Mai und Juni) und in die erste Hälfte des folgenden Wintersemesters (Oktober, November, Dezember). Die Fundzahlen der 4 Pilze sind für diese Monate in der untenstehenden Tabelle zusammengestellt. Die beigefügten Monatsmittel der Temperaturen entstammen den Aufzeichnungen des Basler meteorologischen Bureaus.

Monate	Okt. 05	Nov. 05	Dez. 05	April 06	Mai 05	Juni 05
Beobacht. Monatsmittel d. Temp.	5.3 °	4,5 °	1,7 °	9,0 °	12,3 °	17,7 °
Normalmittel aus 40jähr. Beob.[1])	9,2 °	4,7 °	0,6 °	9,6 °	13,3 °	17,1 °
Alternaria tenuis	1	1	0	2	4	1
Macrosporium commune . . .	1	0	0	0	2	0
Hormodendron cladosporioïdes	3	4	0	0	1	0
Cladosporium herbarum . . .	1	0	3	1	1	0

In den Herbst- und Wintermonaten treten *Hormodendron* und *Cladosporium*, in den wärmeren Frühlingsmonaten *Alternaria* und *Macrosporium* stärker hervor. Aus der chronologischen Zusammenstellung ergibt sich also im wesentlichen das gleiche Resultat wie aus den oben erwähnten Kulturversuchen: Weitgehende Anpassung an verhältnismäßig niedrige Temperaturen (unter 10°), besonders auffallend bei *Hormodendron* und *Cladosporium*.

Eine ausgedehntere Fundstatistik würde dieses Bild ohne Zweifel noch schärfer hervortreten lassen, als das angeführte, zu statistischen Zwecken äußerst bescheidene Zahlenmaterial. Dabei darf aber nicht vergessen werden, daß neben der Temperatur die Häufigkeit der abgestorbenen Pflanzenmassen mindestens ebenso bedeutsam für die zeitliche Verteilung unserer Versuchsobjekte ist.

3. Sauerstoff. Daß die untersuchten 4 Pilze obligat aërobe Organismen sind, ergibt sich mit beinahe absoluter Sicherheit aus ihrem natürlichen Vorkommen.

Der zu beschreibende Versuch vom November 1906 gibt hiefür bloß die Bestätigung.

Kleine Erlenmeyerkulturen (zu 25 ccm) wurden in einer reinen Stickstoffatmosphäre von ca. 600 mm Druck (= ca. $^4/_5$ des Atmosphärendrucks) gehalten. Den nötigen Stickstoff hatte ich mir selbst durch Überleiten von Luft über Rollen von glühendem, frisch reduziertem Kupferdrahtnetz dargestellt. Leider war eine genügende Befreiung der Nährlösung von dem absorbierten Sauerstoff nicht möglich, da die benützte Wasserstrahlpumpe nur eine Verdünnung von 80 mm gestattete. Die Kulturen ergaben sämtlich kleine, aber sterile Mycelien, die sich mit aërob erwachsenen nicht vergleichen ließen. Der wenige, den Kulturen nicht entzogene Sauerstoff hatte für ein bescheidenes Anwachsen genügt. Nachdem er aufgebraucht war, war auch die Entwicklung dauernd gehemmt.

1) Aus den Jahren 1864—1903.

B. Die Kohlenstoffquelle.

Bei allen bis jetzt erwähnten Kulturen wurde ausschließlich Dextrose in einer Konzentration von 2, meistens aber 5% benützt. Auf die Eignung der Dextrose als Kohlenstoffquelle hatten einerseits das natürliche Vorkommen der Pilze, anderseits die Erfahrungen an anderen stickstoffbindenden Organismen, wie *Clostridium Pasteurianum* und *Azotobacter*, hingewiesen.

In der freien Natur kommen für die untersuchten Pilzformen in erster Linie Zellulose und ihre Spaltungsprodukte — darunter auch die Dextrose — als Kohlenstoffquellen in Frage. Es war daher zu prüfen, ob sich die Pilze auf einem Substrat entwickelten, in welchem statt Dextrose Zellulose geboten war. Sorgfältig gereinigte Petrischalen wurden im Oktober 1905 mit sogenannten „aschenfreien" Filtern von 9 cm Durchmesser ausgelegt und mit einer kleinen Menge — etwa 10 bis 15 ccm — der folgenden mineralischen Lösung beschickt.

100 ccm destilliertes Wasser,
0,1 g Monokaliumphosphat,
0,02 g Magnesiumsulfat,
Spuren Natriumchlorid und Ferrosulfat.

Sämtliche Pilze lieferten in diesen Kulturen Mycelien, welche das ganze Filter mit einem dunkeln Schleier bedeckten. Auch die Fruktifikation erfolgte, namentlich bei *Macrosporium*, sehr ausgiebig.

In Hängetropfen der gleichen mineralischen Lösung wurden kleine Stückchen von Jute- und Nesselfaser (erstere verholzt) von den aus den Sporen auswachsenden Hyphen stellenweise dicht umsponnen. Ob dabei die Fasern von den Hyphen durchbohrt oder bloß oberflächlich korrodiert wurden, konnte in den betreffenden Kulturen nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Dafür, daß dies wirklich geschieht, spricht das Verhalten der Pilzhyphen in den abgestorbenen Stengeln, die nun allerdings nicht Reinkulturen des einen oder andern Pilzes darstellen.

In dem dürren Stengel von *Lappa*, der mir den Hauptstamm von *Hormodendron* geliefert hatte, war das ganze zentrale und das randständige Parenchym von Pilzhyphen nach allen Richtungen durchzogen; in den randständigen Parenchymkomplexen, sowie in fast allen Siebteilen war ein großer Teil der Zellwände zerfallen. Es fand sich an diesen Stellen reichliches Hyphengewirr. Selbst in den dickwandigen Bastfasern konnten nach Färbung mit Kongo-

rot leicht auf Quer- und Längsschnitten Pilzhyphen gefunden werden. Die eine der Figuren gibt ein Querschnittsbild wieder. Den Wänden der Fasern liegen im Innnern die Hyphen eng an. Sichtbar sind von den Hyphen die je nach deren Verlauf kreisförmigen bis langgestreckten Querschnitte (in der Figur dunkel gehalten).

In dem ungefärbten Querschnitt des Stengels einer größeren Umbellifere (wahrscheinlich *Heracleum*) waren in den Bastfaserwänden reichlich Korrosionen zu sehen, die sich aber durchaus nicht als Tüpfelkanäle deuten ließen. Sie fanden sich nur in der einen und nicht wie Tüpfelkanäle in den beiden anstoßenden Wänden. Auch in der Figur heben sich die Korrosionen von den Tüpfelkanälen recht deutlich schon durch ihre zum Teil unregelmäßige Form ab.

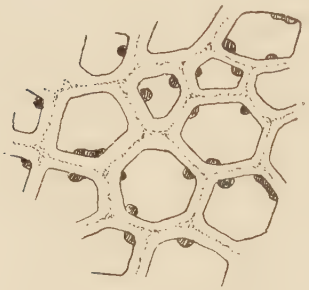

Fig. 2. Querschnitt durch ein Bastbündel von *Lappa minor*. Im Innern der Bastfasern sind die Pilzhyphen erkennbar (nach einem mit Kongorot gefärbten Präparate). Vergr. 900.

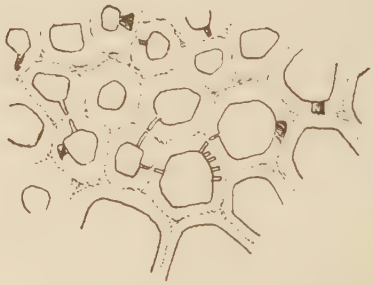

Fig. 3. Querschnitt durch ein Bastbündel einer Umbellifere *(Heracleum?)*. Die Wände der Bastfasern zeigen Corrosionen (nach einem ungefärbten Präparate). Vergr. 900.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß sich in den untersuchten Stengeln Eiweißreste weder durch Jodreaktion noch mit dem Millonschen Reagens nachweisen ließen. Es handelte sich immer um die nach der Fruchtreife zurückbleibenden, ausgedörrten Reste. Sie, und nicht etwa die noch vegetierenden Pflanzen, sind es, die von den Pilzen bewohnt werden. Nicht das spärliche Eiweiß, das da und dort in einem derartigen Stengel sich noch findet, sondern die reichen Vorräte an Kohlehydraten in Form der Zellwände werden vom Pilze hauptsächlich gesucht und ausgenützt. Für diese Auffassung spricht nicht nur die in Kulturen festgestellte Befähigung zur Verwertung von elementarem Stickstoff, die sich wohl in allmählicher Anpassung an die natürlichen Ernährungsverhält-

nisse entwickelt haben mag, sondern auch die relativ große Spezialisierung der Ansprüche an die Beschaffenheit des kohlehydratischen Materials, wie sie durch den Ausfall der beiden folgenden Versuchsreihen gelehrt wird.

Zu der S. 35 angegebenen mineralischen Lösung wurden beigefügt als Kohlenstoffquellen: in der Reihe I vom 9. Februar 1906: Glyzerin, Erythrit, Mannit, Arabinose, Dextrose, Saccharose, Laktose, Maltose, Stärke, Inulin und Zellulose in Form von Filtrierpapierfetzen (von „aschenfreien“ Filtern); in der Reihe II vom 25. August 1906: Xylose, Dextrose und Saccharose, wo es sich tun ließ, in Konzentrationen, die 5 % Dextrose äquimolekular waren.

Geimpft wurde in Reihe I mit *Alternaria*, *Macrosporium* und *Hormodendron*, in Reihe II außerdem noch mit *Cladosporium*.

Der Zustand von Reihe I nach 42 und derjenige von Reihe II nach 29 Tagen ist in der folgenden Tabelle schätzungsweise registriert. Für jeden Pilz ist links die vegetative Entwicklung, in der Mitte die Fruktifikation verzeichnet, beides in den Abstufungen 0, 1, 2, 3; die Kolonne rechts enthält jeweilen die Summe der beiden ersten Zahlen als Maß für die Gesamtentwicklung.

Von den beiden äußersten Hauptkolonnen rechts gibt die erste die Quersummen, die zweite die hieraus folgenden Durchschnitte

Reihe	Kohlenstoffquelle	Konzentration in %	*Alternaria*			*Macrosporium*			*Hormodendron*			*Cladosporium*			Quersumme			Querdurchschn.		
I u. II	ohne C-Quelle		1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	4	0	4	1	0	1
I	Glyzerin . . .	2,60	1	0	1	1	0	1	2	1	3	—	—	—	4	1	5	1,3	0,3	1,6
I	Erythrit . . .	3,35	1	0	1	1	0	1	2	1	3	—	—	—	4	1	5	1,3	0,3	1,6
I	Mannit . . .	5,05	1	0	1	1	1	2	2	2	4	—	—	—	4	3	7	1,3	1,0	2,3
II	Xylose	4,05	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	4	0	4	1	0	1
I	Arabinose . .	4,05	1	0	1	1	1	2	2	2	4	—	—	—	4	3	7	1,3	1,0	2,3
I u. II	Dextrose . .	5,00	3	3	6	3	3	6	3	3	6	3	3	6	**12**	**12**	**24**	**3**	**3**	**6**
I u. II	Saccharose .	9,50	2	0	2	2	0	2	2	1	3	2	1	3	8	2	10	2,0	0,5	2,5
I	Maltose . . .	10,00	3	2	5	3	3	6	3	3	6	—	—	—	9	8	17	3,0	2,6	5,6
I	Laktose . . .	10,00	2	0	2	2	0	2	2	2	4	—	—	—	6	2	8	2	0,6	2,6
I	Stärke	0,60	1	0	1	1	1	2	2	1	3	—	—	—	4	2	6	1,3	0,7	2,0
I	Inulin	?	3	2	5	3	2	5	3	3	6	—	—	—	9	7	16	3	2,3	5,3
I	Zellulose . . .	?	2	2	4	2	2	4	3	2	5	—	—	—	7	6	13	2,3	2,0	4,3
	Summen . . .		21	9	30	21	13	34	27	21	48	6	4	10						
	Durchschn. .		1,8	0,7	2,5	1,8	1,0	2,8	**2,2**	**1,8**	**4,0**	2,0	1,3	3,3						

der Horizontalreihen an, als Maß für den Wert der betreffenden Verbindung für die 3 oder 4 Pilze.

Am Fuße der Vertikalreihen sind die Summen und Durchschnitte angeführt, als Maß für die Befähigung jedes einzelnen Pilzes, auf verschiedenen Kohlenstoffquellen auszukommen.

Vegetation und Fruktifikation gehen also durchaus nicht überall nebeneinander her. In einem großen Teil der Fälle, ja selbst auf der rein mineralischen Lösung erfolgte die Bildung kleiner steriler Mycelflocken, in anderen stand die Fruktifikation zur vegetativen Entwicklung in keinem Verhältnis.

Weitaus am geeignetsten für alle Pilze war die Dextrose. Ihr schlossen sich an Maltose, Inulin und Zellulose. Geringes Wachstum ergaben Saccharose, Laktose und der allerdings ziemlich verdünnte Stärkekleister. Die beiden Pentosen, Xylose und Arabinose, scheinen sich noch weniger zu eignen. Von den mehrwertigen Alkoholen gestattete einzig Mannit bei *Hormodendron* eine etwas ergiebigere Gesamtentwicklung als die mineralische Kontrolle. Auch die Zellulose hatte eine ziemlich gute Entwicklung gegeben. Daß sie hinter der auf Dextrose erzielten etwas zurückstand, ist darauf zurückzuführen, daß die Zellulose als unlöslicher fester Körper für den Pilz in der Kulturflüssigkeit ungleich schwerer erreichbar ist, als die in gelöstem Zustand in dem ganzen Substrat gleichmäßig verteilte Dextrose.

Von den 4 Pilzen zeigen sich nach den am Fuße der Kolonnen notierten Summen und Durchschnitten *Hormodendron* und aller Wahrscheinlichkeit nach auch *Cladosporium* weniger spezialisiert als *Alternaria* und *Macrosporium*. Überall da, wo diese letzteren nur schwaches Wachstum aufwiesen, auf den mehrwertigen Alkoholen, Arabinose, den Disacchariden Saccharose und Laktose, der Stärke, waren *Hormodendron* und *Cladosporium* ihnen überlegen. Möglicherweise geht die Spezialisierung in den Ansprüchen an die Qualitität der Kohlenstoffquelle der Ausbildung zur Stickstoffassimilation parallel.

Es muß jedoch zum Schlusse dieser Diskussion ausdrücklich betont werden, daß ihr Ergebnis nur für Kulturen Geltung hat, denen Stickstoffverbindungen absichtlich nicht zugesetzt waren. Es ist nach zahlreichen Erfahrungen an anderen Objekten (vgl. hierüber Pfeffers Physiologie und Josts Vorlesungen) gar nicht ausgeschlossen, daß Verbindungen, die sich unter den hier eingehaltenen Bedingungen als gänzlich ungeeignet herausstellten, bei Darbietung von stickstoffhaltigem Material leidlich gute Kohlenstoffquellen ab-

geben. Das relativ gute Gedeihen von *Alternaria*, *Macrosporium* und *Hormodendron* auf Maltose und Inulin dürfte vielleicht zu erklären sein durch einen möglicherweise nicht sehr niedrigen Stickstoffgehalt der verwendeten Präparate. Für die übrigen Verbindungen ist eine derartige Eventualität jedoch ausgeschlossen.

Den eben besprochenen Versuchen über die Eignung verschiedener Verbindungen als Kohlenstoffquellen mögen noch einige Angaben folgen über den

Dextroseverbrauch in einer Anzahl großer Kulturen in 100 ccm Lösung. Bestimmungen des Dextroseverbrauches wurden vorgenommen in den beiden Kulturreihen vom 25. August 1906 und vom 16. Februar 1907. Dabei wurde folgendermaßen verfahren:

Von dem Gesamtfiltrat, meist 200 ccm, wurde ein Teil derart verdünnt, daß eine Lösung mit weniger als 1 % Dextrose resultierte. Je 25 ccm derselben dienten zur Bestimmung nach der von Fresenius (S. 595) beschriebenen Methode von Allihn. Es unterblieb jedoch die Reduktion des gefällten Kupferoxyduls, da parallele Versuche mir gezeigt hatten, daß die Wägung des Oxyduls ebenso brauchbare Resultate gab wie die des metallischen Kupfers. Aus den Dextrosemengen in 25 ccm des verdünnten Filtrats wurden durch entsprechende Multiplikation die Dextrosemengen im Gesamtfiltrat berechnet, wobei sich natürlich die absolute Genauigkeit erheblich verminderte, so daß die mitgeteilten Zahlen nur auf 0,02 bis 0,03 g genau sein können.

In den Kulturen vom 25. August 1906 sind die Dextrosemengen für jeden Kolben gesondert abgewogen worden. Sie betrugen nur wenig mehr oder weniger als 5 g. Bei den Kulturen vom 16. Februar 1907 wurden auf einen Liter Lösung 50,0 g abgewogen, sodaß auf 100 ccm 5,00 g Dextrose entfielen.

Nebenstehend ist in einer Tabelle verzeichnet: Alter, Dextroseverbrauch, Trockengewicht und assimilierter Stickstoff. Es beziehen sich die Zahlen der oberen Horizontalreihen jeweils auf die Kultur vom August 1906, die der unteren auf diejenige vom Februar 1907.

Der Dextroseverbrauch übersteigt regelmäßig das gebildete Trockengewicht um einen recht ansehnlichen Betrag:

Auf 1 g Trockensubstanz kommt bei

	Alternaria	*Macrosporium*	*Hormodendron*	*Cladosporium*
ein Dextrose-	8,14 g	4,56 g	4,86 g	3,80 g
verbrauch von	3,44 „	4,06 „	4,22 „	4,87 „

Pilzform	Alter der Kultur Tage	Dextrose-verbrauch g	Trocken-gewicht mg	Assi-milierter N mg
Alternaria tenuis	112	1,02	125,3	1,34
	42	0,50	145,5	4,38
Macrosporium commune	117	0,41	90,6	2,90
	42	0,46	113,2	4,50
Hormodendron cladosporioïdes	105	0,86	177,0	3,17
	39	0,81	191,8	1,16
Cladosporium herbarum	105	0,59	155,1	1,66
	39	0,48	98,5	2,86

Die Zahlen decken sich bei den 3 letzten Formen verhältnismäßig gut. Bei *Alternaria* besteht zwischen der älteren und der jüngeren Kultur eine sehr auffällige, mir einstweilen unerklärliche Differenz. Weitgehende Übereinstimmung darf anderseits bei diesen und ähnlichen Werten keineswegs erwartet werden: die im Stoffwechsel auftretenden Quantitätsrelationen sind nicht in dem Maße konstant wie bei einer einfachen chemischen Umsetzung. Hier handelt es sich bloß um die Feststellung, daß der Dextroseverbrauch das Trockengewicht durchweg weit übersteigt.

Es ist unmöglich anzugeben, wie viel von dem Gesamtverbrauch auf den Aufbau der Trockensubstanz und wieviel auf „Dissimilation“ entfällt. Nach 6 von Jost (a. a. O.) mitgeteilten Elementaranalysen verschiedener Objekte enthält die pflanzliche Trockensubstanz im Mittel 45,9% Kohlenstoff, Dextroseanhydrid enthält 40,0%. Zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs von einem Gramm Trockensubstanz wäre also ca. 1,12 g Dextroseanhydrid nötig. Wenn diese Berechnung auch für die untersuchten Pilze zulässig sein sollte, so würde der zu dem Aufbau der Trockensubstanz verwendete Anteil recht beträchtlich hinter dem „dissimilierten“ Anteil zurückstehen.

Mehr Interesse als das Verhältnis $\frac{\text{Dextroseverbrauch}}{\text{Trockengewicht}}$ beansprucht die quantitative Beziehung des Dextroseverbrauchs zu dem assimilierten Stickstoff. Aus der Tabelle folgt, daß auf 1 g verbrauchter Dextrose an Stickstoff gebunden wurden bei

	Alternaria	*Macrosporium*	*Hormodendron*	*Cladosporium*
i. d. Kultur v. 25. VIII. 06	1,31 mg	7,07 mg	3,69 mg	2,81 mg
i. d. Kultur v. 16. II. 06	8,74 „	9,78 „	1,43 „	5,96 „
im Durchschnitt	5,02 „	8,92 „	2,56 „	4,38 „

Diese Zahlen übertreffen weit die von Winogradsky (II, S. 353) für *Clostridium Pasteurianum* ermittelten Werte: bei 20tägiger Kultur 1,22 mg im einen, 1,34 mg im anderen Fall. Sie decken sich annähernd mit den von Ternetz für den „*Oxycoccus*-Pilz" mitgeteilten: bei 31tägiger Kultur 6,34 mg bei dem einen, 9,97 mg bei einem zweiten Versuch. Diese höheren Zahlen von Ternetz und mir erklären sich dadurch, daß die Dextrose von den untersuchten Pilzen normal veratmet und nicht, wie von *Clostridium Pasteurianum*, vergoren wird. Zur Erreichung eines bestimmten Energiegewinnes ist bei der Vergärung eine größere Dextrosemenge nötig als bei der Veratmung.

Dafür, daß von *Alternaria*, *Macrosporium*, *Hormodendron* und *Cladosporium* die Dextrose veratmet wird, spricht folgendes:

1. Alle 4 Pilze sind obligat aërobe Organismen.

2. Azidimetrische Bestimmungen in der vom Mycel abfiltrierten Lösung ergaben, daß eine Säuerung des Substrats nicht stattfand.

3. Gasentwicklungen waren in keiner einzigen Kultur zu beobachten.

4. Eine Anzahl kleiner Kulturen, welche in einem abgeschlossenen Volum von Sauerstoff bei einer dem Sauerstoffteildruck in der Atmosphäre entsprechenden Verdünnung gehalten wurden, hatten nach ca. 3 Tagen ungefähr 0,16 g Kohlendioxyd gebildet, wie eine rohe, sicher zu niedrig ausgefallene Bestimmung (Fällung von Baryumkarbonat aus Barytwasser) ergeben hatte. Dabei war der Manometerstand im Rezipienten unverändert geblieben. Es mußte also ebenso viel freier Sauerstoff verbraucht worden sein, als Kohlendioxyd gebildet wurde, ein Verhältnis, das der normalen Verbrennung des Traubenzuckers entspricht.

Die Kohlenstoffquelle wird somit auch von *Alternaria tenuis*, *Macrosporium commune*, *Hormodendron cladosporioïdes* und *Cladosporium herbarum* besser ausgenützt als von *Clostridium Pasteurianum*.

Nach den durchschnittlich auf 1 g verbrauchter Dextrose gebundenen Stickstoffmengen erhalten wir die gleiche „Rangordnung" wie bei Berücksichtigung der absoluten Werte: *Macrosporium*, *Alternaria*, *Cladosporium* und *Hormodendron*.

V. Schlußbetrachtung.

Alle die mitgeteilten und erörterten Beobachtungen an den 4 Pilzformen *Alternaria tennis*, *Macrosporium commune*, *Hormodendron cladosporioïdes* und *Cladosporium herbarum* weisen darauf hin, daß man es mit Organismen zu tun hat, die an teilweise eng begrenzte Lebensbedingungen angepaßt sind.

Sie gedeihen auf Substraten, die sehr arm an Stickstoffverbindungen und reich an Kohlehydraten sind. Auf deren Kosten verschaffen sie sich aus der Luft den nötigen Stickstoff.

Für *Alternaria tennis* und *Hormodendron cladosporioïdes* ist diese Behauptung schon früher aufgestellt worden; sie hat durch die vorliegende Arbeit eine nicht unnötige Bestätigung erfahren. Mit *Macrosporium commune* und *Cladosporium herbarum* ist dagegen die Reihe der stickstoffbindenden Organismen um zwei neue Formen bereichert worden.

Alle 4 Pilze gewinnen aber durch ihre eigenartige Lebensweise und ihre überaus große Verbreitung auch quantitativ eine Bedeutung im Kreislauf von Kohlenstoff und Stickstoff. Der in Form der Zellulosegerüste toter Pflanzenteile für die grünen Pflanzen gänzlich wertlose Kohlenstoff wird von den Pilzen bei ihrer Atmung in die Form gebracht, in der er allein von der grünen Pflanze resorbiert werden kann, in die des Kohlendioxyds. Und dieser Prozeß liefert außerdem die Energie zur Überführung des für die meisten Lebewesen unbrauchbaren elementaren Stickstoffes in lebende Substanz, aus welcher er durch weitere Prozesse, wie Eiweißzersetzung und Nitrifikation, in die wertvolle Form von Ammon- und Salpeterstickstoff gebracht werden kann.

Die absoluten Stickstoffmengen, welche durch die untersuchten Pilze und möglicherweise auch durch zahlreiche andere Angehörige der auf abgestorbenem Pflanzenmaterial ansassigen Pilzflora dem Erdboden in dieser Weise wieder zugeführt werden, lassen sich kaum auch nur schätzungsweise berechnen. Es ist aber nicht zu bezweifeln, daß sie neben den von *Clostridium Pasteurianum*, *Azotobacter* und vielleicht auch anderen Bodenbakterien assimilierten Quantitäten nicht allzusehr zurückstehen. Von Henry (S. 411) und Montemartini (S. 1060) wurden wenigstens in gefallenem Laub recht ansehnliche Stickstoffzunahmen nachgewiesen; und nach Montemartinis Versuchen handelte es sich um die Wirkung von Mikroorganismen. Daß dabei Pilze tätig waren, ist nicht festgestellt, scheint aber gar nicht unwahrscheinlich.

Die eigenartige Bedeutung der Stickstoffbindung bei *Alternaria*, *Macrosporium*, *Hormodendron* und *Cladosporium* besteht darin, daß Zellulose und eventuell auch andere, ihr nahestehende Bestandteile pflanzlicher Zellwände als Energiequelle ausgenützt werden. *Clostridium Pasteurianum* und *Azotobacter* sind dazu nicht befähigt.

Anhang: Das Verhalten von *Aspergillus niger* und von *Penicillium glaucum* auf stickstoffarmer Lösung.

Schon oben (S. 12) wurde erwähnt, daß *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* auf der für die anderen Pilze äußerst günstigen Nährlösung ohne absichtliche Stickstoffzusätze nur kümmerlich gediehen. Dieser Bemerkung sei hier noch einiges beigefügt:

Beide Pilze wurden wiederholt aus Reinkulturen auf Brot in den bei den Isolierungsversuchen benützten Agar sowie in die für die anderen Pilze gebrauchte Nährlösung übergeimpft. Auffällig war, daß namentlich *Aspergillus* auf dem festen Nährboden erheblich schlechter wuchs als in der Nährlösung.

Auf dieser gedieh, soweit sich nach Größe und Zahl der Mycelien beurteilen läßt, *Penicillium* stets besser als *Aspergillus*. Das ganze Verhalten der Pilze legte die Vermutung nahe, daß sie nur so lange wuchsen, bis sie den wenigen Stickstoff der Nährlösung aufgezehrt hatten. Unverständlich blieb bei dieser Annahme nur die manchmal recht ausgiebige Fruktifikation.

Am 16. Februar 1907 wurden daher große Kulturen in 100 ccm Nährlösung mit 5 % Dextrose angelegt, völlig parallel zu den gleichzeitig geimpften Kulturen der übrigen Pilze.

Leider sind die beiden Parallelbestimmungen in der Nährlösung von *Aspergillus* verunglückt, so daß nur der Stickstoffgehalt des Mycels angegeben werden kann.

Art und Alter der Kultur	Trockengewicht	N im Mycel	N im Filtrat	Gesamt-N der Kultur
Kultur von *Aspergillus niger*		1,53		
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 27. III. 07	28,9	1,42	?	?
Alter: 39 Tage		1,31		
Kultur von *Penicillium glaucum*		1,04	1,90	2,94
Geimpft: 16. II. 07, untersucht: 30. III. 07	41,6	0,93	1,29	2,22
Alter: 42 Tage		0,82	0,68	1,50

In der folgenden Tabelle ist der mittlere Anfangs-Stickstoffgehalt von 0,96 + 0,24 mg mit dem Endgehalt verglichen:

Pilzform und Alter der Kultur	Anfangs-N	End-N	N-Zunahme
Aspergillus niger Alter: 39 Tage	1,20	1,53	0,81
	0,96	(1,42)	(0,46)
	0,72	1,31	0,11
Penicillium glaucum Alter: 42 Tage	1,20	2,94	2,22
	0,96	2,22	1,26
	0,72	1,50	0,30

Aspergillus niger und *Penicillium glaucum* haben in diesen Kulturen ebenfalls, wenn auch nur wenig Stickstoff gebunden. Sie kommen nach ihrer „stickstoffbindenden Kraft“ noch unter *Hormodendron*, die am langsamsten arbeitende Form, zu stehen.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Die 4 Pilzformen *Alternaria tenuis* Nees, *Macrosporium commune* Rbh., *Hormodendron cladosporioïdes* Sacc. und *Cladosporium herbarum* Link, die alle auf abgestorbenen Pflanzenteilen weit verbreitet sind, können isoliert und dauernd kultiviert werden auf Substraten, denen keinerlei Stickstoffverbindungen absichtlich zugesetzt sind.

Die durchgeführten Kulturreihen ergaben nebenbei, daß *Hormodendron cladosporioïdes* und *Cladosporium herbarum* zwei vollständig selbständige Formen und nicht, wie schon mehrfach behauptet wurde, miteinander identisch sind.

2. Die unter allen Vorsichtsmaßregeln aufgestellte Stickstoffbilanz in Kulturen ergibt, daß alle 4 Pilze den elementaren Stickstoff der Luft assimilieren. Unter den eingehaltenen Kulturbedingungen wurden in 100 ccm durchschnittlich gebunden:

von *Macrosporium commune* . . . 3,70 mg Stickstoff
„ *Alternaria tenuis* . . . . . 3,34 „ „
„ *Cladosporium herbarum* . . . 2,26 „ „
„ *Hormodendron cladosporioïdes* . 1,93 „ „

Die größte Stickstoffzunahme im Betrag von 4,50 mg wurde in einer Kultur von *Macrosporium*, die kleinste, 1,16 mg, in einer Kultur von *Hormodendron* gefunden.

3. Der Stickstoffgehalt der Trockenernten (zwischen 100 und 200 mg) war ein ziemlich niedriger und von Kultur zu Kultur wechselnder. Im allgemeinen betrug er etwas weniger als 1%. Der assimilierte Stickstoff belief sich meist auf mehr als 1% (im Maximum bis auf 3,97%) der Trockenernte.

4. Außer dem bereits bekannten positiven Heliotropismus der Conidienträger von *Hormodendron cladosporioïdes* konnten Beeinflussungen von Wachstum und Fruktifikation durch Beleuchtung nicht beobachtet werden.

5. Alle 4 Pilzformen, vorab *Hormodendron* und *Cladosporium*, sind imstande, bei Temperaturen zwischen 0° und 10° zu wachsen.

6. Alle 4 Formen brauchen zu ihrem Wachstum Sauerstoff, sie sind obligat aërobe Organismen.

7. Als Kohlenstoffquelle ist Dextrose weitaus am geeignetsten. Auf Zellulose, dem unter natürlichen Verhältnissen in erster Linie in Betracht fallenden Kohlehydrat, erfolgt auch in Kulturen reichliches Wachstum. Pentosen oder gar mehrwertige Alkohole sind gänzlich ungenügende Kohlenstoffquellen.

8. Der Dextroseverbrauch in den Kulturen betrug regelmäßig ein Mehrfaches der gebildeten Trockensubstanz.

9. Gärungserscheinungen waren bei keinem der 4 Pilze zu beobachten. Die Dextrose unterliegt der normalen Veratmuung.

10. Damit steht in Zusammenhang, daß die auf 1 g verbrauchter Dextrose assimilierten Stickstoffmengen durchweg größer sind als bei *Clostridium Pasteurianum*, das den Energiewert der Dextrose bei der Vergärung nur unvollständig ausnützt. Auf 1 g verbrauchter Dextrose wurden durchschnittlich assimiliert

von *Macrosporium commune* . . .	8,92	mg	Stickstoff
„ *Alternaria tenuis*	5,02	„	„
„ *Cladosporium herbarum* . . .	4,38	„	„
„ *Hormodendron cladosporioïdes* .	2,56	„	„

11. Der experimentell festgestellten Bindung von elementarem Stickstoff durch die untersuchten Pilze kommt eine große Bedeutung zu im Kreislauf von Kohlenstoff und Stickstoff. Der für die meisten Organismen nicht verwertbare atmosphärische Stickstoff wird in gebundene Form übergeführt und damit den Lebensprozessen zugänglich gemacht. Der Vorgang, der die Energie zu dieser Leistung zu liefern hat, die Veratmung der für die grünen

Pflanzen wertlosen toten Zellulosemassen, hat zum Endprodukt das Kohlendioxyd, das die einzige Kohlenstoffquelle für die chlorophyllführenden Pflanzen und damit eigentlich das erste Rohmaterial zum Aufbau organischer Substanz darstellt.

12. Die schon oft wiederholte Angabe, daß auch *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* elementaren Stickstoff binden, wird durch die Untersuchung von je einer Kultur bestätigt.

Die vorliegende Arbeit wurde im botanischen Institut der Universität Basel auf Anregung und unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Alfred Fischer ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer spreche ich auch an dieser Stelle für das meinen Untersuchungen stets entgegengebrachte Interesse und für die mancherlei wertvollen Ratschläge den besten Dank aus.

Literatur-Verzeichnis.

Berthelot, Recherches nouvelles sur les microorganismes fixateurs de l'azote libre. Comptes rendus der Pariser Akademie., Bd. CXVI. 1893.

Boussingault, Agronomie, Bd. II.

Czapek, I, Biochemie der Pflanzen, Bd. II.

— II, Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung usw. Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., Bd. II, 1902.

Costantin, Sur les variations des *Alternaria* et des *Cladosporium*. Revue générale de Botanique, 1889.

Frank, B., I, Lehrbuch der Botanik, Bd. I.

— II, Die Stickstoffbindung in der Pflanzenwelt. Botanische Zeitung, 1893.

Fresenius, Anleitung zur quantitativen chemischen Analyse, Bd. II, 6. Auflage, 1905.

Heinze, Sind Pilze imstande, den elementaren Stickstoff der Luft zu verarbeiten und den Boden an Gesamtstickstoff anzureichern? Annales mycologici, vol. IV, 1906,

Henry, in Journal d'agriculture pratique, 1897, II.

Janczewsky, *Cladosporium herbarum* i jego najpospolitsze na zbozu towarzysze, 1894.

Jodin, Du rôle physiologique de l'azote. Comptes rendus d. Pariser Akademie, Bd. LV, 1862.

Jost, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie.

Koch, A., Die Bindung von freiem Stickstoff durch freilebende niedere Organismen. Lafars Handbuch der technischen Mycologie, Bd. III.

König, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel, 4. Auflage, 1903, Bd. I.

Laurent, Recherches sur le polymorphisme du *Cladosporium herbarum*. Annales de l'Institut Pasteur, Bd. II, 1888.

Montemartini, Le fissazione del'azoto atmosferico durante la decomposizione delle foglie cadute dagli alberi. Le stazioni sperimentali agrarie italiane, Bd. XXXVIII, 1905.

Pfeffer, Pflanzenphysiologie, I. Bd.: Stoffwechsel.

Puriewitsch, Über Stickstoffassimilation bei den Schimmelpilzen. Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, Bd. XIII, 1895.

Saida, Über Assimilation freien Stickstoffes durch Schimmelpilze. Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, Bd. XIX, 1901.

Schostakowitsch, Über die Bedingungen der Konidienbildung bei Rußtaupilzen. Flora, 1895. Ergänzungsband.

Ternetz, Die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch einen torfbewohnenden Pilz. Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft, Bd. XXII, 1904.

Vogel, Die Assimilation des freien, elementaren Stickstoffes durch Mikroorganismen. Centralblatt für Bakteriologie usw, 2. Abteilung, Bd. XV, 1906.

Winogradsky, I, *Clostridium Pasteurianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. Centralblatt für Bakteriologie usw., 2. Abteilung, Bd. IX, 1902.

— II, Sur l'assimilation de l'azote gazeux par les microbes. Comptes rendus der Pariser Akademie, Bd. CXVIII, 1894.

Inhaltsübersicht.

Seite

I. Historisches über die Assimilation von elementarem Stickstoff durch Pilze 256

II. Die untersuchten Pilzformen: ihr Vorkommen auf abgestorbenem Pflanzenmaterial und ihre Isolierung 259

A. Das Isolierungsverfahren 260

B. Die isolierten Pilze und ihre Verbreitung 261

III. Wachstum und Stickstoffbindung auf stickstoffarmem Substrat . . . 264

A. Methode und Resultate von Kulturversuchen unter möglichst weitgehendem Ausschluß von gebundenem Stickstoff 264

B. Quantitative Untersuchungen über die Stickstoffbindung 268

IV. Untersuchungen über einige formale Lebensbedingungen der stickstoffbindenden Pilze 286

A. Licht, Temperatur und Sauerstoff 287

B. Die Kohlenstoffquelle 290

V. Schlußbetrachtung 297

Anhang. Das Verhalten von *Aspergillus niger* und von *Penicillium glaucum* auf stickstoffarmer Lösung 298

Zusammenfassung der Resultate 299

Literatur-Verzeichnis 301

Ich, Hermann Heinrich Froehlich aus Basel wurde am 5. März 1885 geboren als Sohn des hier wohnhaften Lehrers Heinrich Froehlich und der Maria geb. Huber.

Ich besuchte in Basel das Gymnasium in den Jahren 1895 bis 1903. Nach Absolvierung der Maturitätsprüfung immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1903 an der philosophischen Fakultät der Universität Basel. Hier hörte ich Vorlesungen bei den Herren Prof. Dr. E. Hagenbach-Bischoff, Prof. Dr. A. Kinkelin, Prof. Dr. C. Schmidt, Prof. Dr. F. Zschokke, Prof. Dr. A. Riggenbach, Prof. Dr. A. Fischer, Prof. Dr. R. Burckhardt, Prof. Dr. H. Rupe, Prof. Dr. F. Fichter, Prof. Dr. H. Veillon, Prof. Dr. K. Joël, Prof. Dr. E. Tappolet, Prof. Dr. F. Heman, Dr. R. Flatt, Dr. A. Tobler, Dr. G. Senn, Dr. O. Spieß und Dr. M. Großmann. – Ich besuchte die Practica der Herren Prof. Dr. E. Hagenbach-Bischoff und Prof. Dr. H. Veillon, Prof. Dr. F. Zschokke, Prof. Dr. A. Fischer, Prof. Dr. F. Fichter, Dr. G. Senn.

Im Frühling 1906 erwarb ich mir das Diplom zum Unterricht an Mittelschulen.

Die vorliegende Arbeit, auf Grund deren ich am 12. Juli 1907 zum Doktorexamen zugelassen worden bin, wurde auf Anregung und unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. A. Fischer im botanischen Institut Basel ausgeführt.